Série A, N° ORSAY
N° d'ordre : 136

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

PAR

Gabriel GINGRAS

1re THÈSE — ÉTUDE COMPARATIVE, CHEZ QUELQUES ALGUES, DE LA PHOTOSYNTHÈSE ET DE LA PHOTORÉDUCTION RÉALISÉE EN PRÉSENCE D'HYDROGÈNE.

2e THÈSE — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le *1966* **, devant la Commission d'examen**

MM. MOYSE ..... *Président*
LAVOREL ..... } *Examinateurs*
JOLIOT ..... }

PARIS-6e
GAUTHIER-VILLARS, Editeur
55, quai des Grands-Augustins
1966

Série A, N° ORSAY
N° d'ordre : 136

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

PAR

Gabriel GINGRAS

1re THÈSE — ÉTUDE COMPARATIVE, CHEZ QUELQUES ALGUES, DE LA PHOTOSYNTHÈSE ET DE LA PHOTORÉDUCTION RÉALISÉE EN PRÉSENCE D'HYDROGÈNE.

2e THÈSE — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le , devant la Commission d'examen

MM. MOYSE ..... *Président*
LAVOREL ..... } *Examinateurs*
JOLIOT ..... }

PARIS-6e
GAUTHIER-VILLARS, Editeur
55, quai des Grands-Augustins
1966

UNIV. LEIDEN BIB.

Faculté des Sciences de l'Université de Paris

Doyen ..... M. Zamansky

PROFESSEURS

Brelot	T	Analyse supérieure.
Prenant	T	Anatomie et Histologie comparées.
Grassé	T	Evolution des êtres organisés.
Prévost	T	Chimie organique.
Wyart	T	Minéralogie et Cristallographie.
Teissier	T	Zoologie.
Mangenot	T	Biologie végétale (Orsay).
Auger	T	Physique quantique et Relativité.
Monnier	T	Physiologie générale.
Piveteau	T	Paléontologie.
Rocard	T	Physique (E.N.S.).
Cartan	T	Mathématiques (E.N.S.).
Laffitte	T	Chimie générale.
N.	T	Géométrie supérieure.
Coulomb	T	Physique du globe.
Mlle Cousin	T	Biologie animale (S.P.C.N.).
Chrétien	T	Chimie minérale.
Bocquet	T	Zoologie.
Kastler	T	Physique (E.N.S.).
Ephrussi	T	Génétique.
Rivière	T	Géologie (S.P.C.N.) et Sédimentologie (Orsay).
Gautheret	T	Biologie végétale (P.C.B.).
Lucas R.	T	Recherches physiques.
Thomas A.	T	Biologie cellulaire.
Arnulf	T	Optique appliquée.
Morand	T	Physique enseignement.
Soleillet	T	Physique (P.C.B.).
Fortier	T	Mécanique expérimentale des fluides.
Drach	T	Zoologie.
Queney	T	Météorologie et Dynamique atmosphérique.
Gallien	T	Embryologie.
Eichhorn	T	Botanique.
De Cugnac	T	Biologie végétale (S.P.C.N.).
Mlle Cauchois	T	Chimie physique.
Thellier	T	Physique du globe.
L'Héritier	T	Biologie générale (Orsay).
Grivet	T	Radioélectricité (Orsay).
Poncin	T	Mécanique générale.
Dubreil	T	Arithmétique et Théorie des nombres.
Champetier	T	Chimie macromoléculaire.
Cuvillier	T	Micropaléontologie.
Jung	T	Géologie.
Trillat	T	Microscopie et Diffraction électronique.
Wiemann	T	Chimie organique et structurale.
Jacquinot	T	Spectroscopie et Physique céleste (Orsay).
Vassy	T	Physique de l'atmosphère.
Destouches	T	Théorie physique.
Amiel	T	Chimie générale.
Hocart	T	Minéralogie et Cristallographie.
Mathieu J.P.	T	Physique optique.
Couteaux	T	Cytologie.
May	T	Zoologie
Choquet	T	Théorie des fonctions et Topologie.
Feldmann	T	Biologie végétale marine.
Guinier	T	Physique des solides (Orsay).
Jost	T	Physiologie comparée.
Fortet	T	Calcul des probabilités et Physique mathématique.
Schwartz	T	Calcul différentiel et intégral.
Chouard	T	Physiologie végétale.
Malavard	T	Aviation (Technique aéronautique).
Normant	T	Synthèse organique.
Benard	T	Chimie minérale.
Buvat	T	Botanique (E.N.S.).
Dugue	T	Statistiques mathématiques.
Soulairac	T	Psychophysiologie.
Ulrich	T	Physiologie végétale appliquée.
Maréchal	T	Optique théorique et appliquée.
Kirrmann	T	Théories chimiques.
Chadefaud	T	Botanique.
Mlle Le Breton	T	Physiologie de la nutrition.
Lelong	T	Application de l'Analyse à la Géométrie.
Devillers	T	Anatomie et Histologie comparées.
Ehresmann	T	Topologie algébrique.
Françon	T	Physique (S.P.C.N.).
Glangeaud	T	Géographie physique et Géologie dynamique.
Godement	T	Mathématiques (M.G.P.).
Pisot	T	Techniques mathématiques de la Physique.
Quelet	T	Chimie organique.
Cagniard	T	Géophysique appliquée.
Lennuier	T	Physique (M.G.P.).
Rizet	T	Génétique (Orsay).
Routhier	T	Géologie appliquée.
Mme Tonnelat	T	Physique théorique.
Dixmier	T	Mathématiques (M.P.C.).
Souchay	T	Chimie générale.
Aigrain	T	Electrotechnique générale.
Brusset	T	Chimie systématique.
Lévy M.	T	Physique théorique des hautes énergies (Orsay).
Mme Chaix	T	Chimie biologique.
Mme Hurel-Py	T	Biologie végétale (P.C.B.).
Pannetier	T	Chimie générale.
Brun	T	Mécanique théorique des fluides.
Lederer	T	Chimie biologique (Orsay).
Mme Dubreil	T	Mathématiques (Agrégation).
Mme Lelong	T	Mathématiques II (E.N.S.).
Bellair	T	Géologie (S.P.C.N.).
Cotte	T	Physique Électricité.
Dubois J.E.	T	Chimie organique.
Lamotte	T	Zoologie (E.N.S.).
Michel A.	T	Chimie minérale (Orsay).
Olmer	T	Energétique générale.
Rouault	T	Electricité (Orsay).
Gauthier	T	Mécanique appliquée.
Barchewitz	T	Chimie physique.
Brossel	T	Physique atomique.
Buser	T	Physiologie comparée.
Camus	T	Physiologie végétale
Castaing	T	Physique II Thermodynamique (Orsay).
Curien	T	Minéralogie et Cristallographie.
Moyse	T	Physiologie végétale (Orsay).
Mme Charniaux-Cotton	T	Evolution des êtres organisés.
Possompes	T	Zoologie.
Pullmann	T	Chimie quantique.
Teillac	T	Physique nucléaire et Radioactivité (Orsay).
Tonnelat	T	Biologie physico-chimique. (Orsay).
Ville	T	Econométrie.
Willemart	T	Chimie (P.C.B.).
Dode	T	Chimie (Orsay).
Freymann	T	Recherches physiques.
Guinochet	T	Biologie végétale (S.P.C.N. Orsay).
Roch	T	Géologie.
Schatzmann	T	Astrophysique.
Termier	T	Géologie générale.
Zamansky	T	Mathématiques générales.
Lucas	T	Géologie.

Allard	T	Chimie physique.
Berthelot	T	Physique des particules fondamentales (Orsay).
Bricart	T	Météorologie et Physique de l'atmosphère.
Mme Albe-Fessard	T	Psychophysiologie.
Friedel	T	Physique des solides (Orsay).
Julia M.	T	Etudes des moléculaires complexes.
Lender	T	Biologie animale (S.P.C.N. Orsay).
Magat	T	Physico-chimie des radio-éléments.
Mlle Quintin	T	Electrochimie.
Monod	T	Chimie du métabolisme.
Benoit	T	Physiologie animale (Orsay).
De Possel	T	Analyse numérique.
Charlot	T	Chimie analytique.
Lemée	T	Ecologie végétale (Orsay).
Guérin	T	Chimie (M.P.C. Orsay).
Chatelet M.	T	Chimie (P.C.B.).
Jean	T	Physique nucléaire (Orsay).
Mattler	T	Physique (S.P.C.N.).
Bergerard	T	Zoologie (Orsay).
Bertein	T	Electronique (Orsay).
Bouissières	T	Radiochimie.
Mme Couture	T	Thermodynamique et Mécanique physique.
Ellenberger	T	Géologie des grandes régions du globe (Orsay).
Franc	T	Biologie animale (P.C.B.).
Schnell		Botanique tropicale.
Stolkowski	T	Physiologie végétale.
Acher	T	Chimie biologique.
Baudoin	T	Biologie animale (P.C.B.).
Beaumont		Biologie animale (S.P.C.N.).
Blamont		Géophysique ionosphère.
Bourreau	T	Botanique.
Curie D.		Physique (M.G.P.).
Durand-Delga	T	Géologie.
Freon	T	Chimie organique (Orsay).
Heller	T	Physiologie végétale.
Tortrat	T	Calcul des probabilités.
Cailleux	T	Géologie (S.P.C.N.).
Magnan		Physique Electricité.
Daudel	T	Mécanique ondulatoire appliquée à la Chimie théorique et à la Physique nucléaire.
Rollet	T	Chimie minérale.
Mlle Josien	T	Chimie (S.P.C.N.).
Chevalley	T	Géométrie algébrique et Théorie des groupes.
Arnoult	T	Electronique (Orsay).
Chapelle	T	Physique I (Orsay).
Delange	T	Mathématiques I (Orsay).
Deny	T	Mathématiques générales (Orsay).
Germain	T	Mécanique théorique des fluides.
Lacombe	T	Métallurgie des métaux nucléaires (Orsay).
Brochard	T	Physique (M.G.P. Orsay).
Cabannes	T	Mécanique générale.
Lesieur	T	Mathématiques I (Orsay).
Mazet	T	Mécanique générale (Orsay).
Caire		Géographie physique et Géologie dynamique.
Comolet		Mécanique des fluides.
Corabœuf	T	Physiologie animale (Orsay).
Delloue	T	Physique de l'exosphère.
Gorenflot		Botanique II (Orsay).
Houillon		Biologie animale (P.C.B.).
Jullien J.		Chimie (S.P.C.N. Orsay).
Malgrange	T	Techniques mathématiques de la Physique (Orsay).
Olivier		Anthropologie.
Nozeran	T	Botanique II (Orsay).
Blanc-Lapierre	T	Physique (E.N.S. Orsay).
Chevaugeon	T	Botanique (Orsay).
Kahane	T	Mathématiques (Orsay).
Samuel	T	Mathématiques (E.N.S. féminine).
Kourganoff	T	Astronomie (Orsay).
Thiry	T	Mécanique céleste.
Abeles		Physique (S.P.C.N.).
Amat	T	Physique (P.C.B.).
Auboin	T	Géologie.
Mme Benoit-Gueutal		Physique nucléaire et Radioactivité (Orsay).
Bougis		Biologie marine (Villefranche-sur-Mer).
Bruhat	T	Mathématiques (M.P.C.).
Brunn	T	Géologie historique (Orsay).
Chabbal	T	Physique (M.G.P. Orsay).
Deheuvels	T	Mathématiques propédeutiques
D'Espagnat	T	Physique théorique (Orsay).
Furon	T	Géologie (S.P.C.N.).
Mme Gans	T	Génétique.
Geneves		Biologie végétale (P.C.B.).
Guilbert		Physique (C.U.S. Orléans).
Hupe	T	Pétrographie.
Hollande	T	Biologie générale.
Lions	T	Analyse numérique.
Maitte	T	Chimie (P.C.B.).
Meyer		Physique propédeutique.
Nicolas		Géologie appliquée.
Panigel		Biologie générale.
Mlle Fourcroy		Biologie végétale (S.P.C.N.).
Mme Choquet-Bruhat	T	Mécanique analytique et Mécanique céleste.
Mlle Veil		Physiologie générale.
Lwoff	T	Microbiologie.
Siestrunck	T	Mécanique physique et expérimentale.
Néron	T	Math. M.P.C. (Orsay).
Mme Pecker - Wimel	T	Astrophysique.
Balkansky		Physique M.P.C.
Le Corre	T	Electricité.
Delcroix	T	Physique théorique (Orsay).
Gourdin		Physique théorique des hautes énergies (Orsay)
Lehmann	T	Phys. exp. des hautes énergies.
Nataf	T	Physique nucléaire et radioactivité (Orsay).
Echalier		Biologie animale P.C.B.
Barraud		Physiologie-cellulaire.
Lioret		Physiologie végétale (Orsay).
Dars		Géologie structurale et géologie appliquée.
Camefort	T	Botanique (agrégation).
Vichniewsky	T	Mécanique industrielle.
Blaquière		Electronique (Orsay).
Arnous	T	Physique théorique.
Tatibouet		Chimie (C.S.U. Orléans).
Mallivin	T	Math. propé. (Orsay).
Gaudemar		Chimie propé.
Perez y Jorba		Physique exp. des hautes énergies (Orsay).
David	T	Chimie (agrégation Orsay).
Brousse	T	Mécanique théorique.
Rosch	T	Astronomie.
Guy	T	Physique expérimentale.
Lazard		Math. M.P.C.
Morel P		Physique M.P.C.
Arsac		Programmation.
Lefebvre		Chimie M.P.C.
Chapeville		Biochimie.
Benoit		Physique C.P.E.M.
Rio		Chimie C.P.E.M.
Jauzein		Géologie E.N.S.
Prevost G		B.V., C.P.E.M.
Favard P.		B.A., C.P.E.M.
Vilkas		Chimie C.P.E.M.
Mlle Ficini		Chimie C.P.E.M.
Lequeux		Astronomie.
Cohen Tannoudji		Physique M.P.C.
Tavernier		Physique C.P.E.M.
Mme Roizen		Physique C.P.E.M.
Durand M.		B.A., S.P.C.N.
Ravier		Pétrographie.
Roseau	T	Mécanique théorique des fluides.

Roubine	Electronique.	Mme Petit ...	B.A., C.P.E.M.
Silber.....T	Chimie (P.C.B.).	Brousse	Géologie (Orsay).
Uebersfeld ....T	Electronique.	Cagniac	Physique agrégation (Orsay).
Yvon .....T	Théories physiques.	Leberre	Zoologie (Orsay).
Hervé .....T	Mathématiques.	Scheffer	Microbiologie (Orsay).
Jancovici	Physique atomique (Orsay).	de Gennes	Physique des solides (Orsay).
Falk-Vairant .	Physique nucléaire (Orsay).	Riou	Physique nucléaire exp. (Orsay).
Fetizon	Chimie propé. (Orsay).	Clauser	Chimie biol. (Orsay).
Pascaud	Physiologie	Chevalier	Physio. animale (Orsay).

Secrétaire général ..... R. Poulain

Physiol. Vég., 1966, 4 (1), 1-65

Étude comparative, chez quelques algues, de la photosynthèse et de la photoréduction réalisée en présence d'hydrogène

Gabriel GINGRAS

Laboratoire de Photosynthèse du CNRS, Gif-sur-Yvette (Essonne), France.

(Manuscrit reçu le 1er décembre 1965)

RÉSUMÉ

Description est faite d'une méthode électrochimique permettant la mesure simultanée des vitesses relatives des échanges photosynthétiques d'O_2 et de CO_2, avec de très faibles échantillons d'algues unicellulaires. Les produits initiaux de la fixation du $^{14}CO_2$ sont identiques en photosynthèse et en photoréduction en présence d'hydrogène, chez *Scenedesmus*. L'inhibition de l'émission photosynthétique d'O_2, par la 3-(4-chlorophényl)-1,1-diméthylurée (CMU) chez *Chlorella*, porte sur une étape thermique située entre les deux réactions photochimiques. Cette étape paraît cinétiquement très proche du substrat de la photoréaction II. L'insensibilité au CMU et l'absence d'exaltation dichromatique de la photoréduction indiquent que ce processus ne dépend que du fonctionnement de la photoréaction I. Le spectre d'action de la photoréduction chez *Scenedesmus* et *Porphyridium* et le calcul des efficacités relatives de divers pigments, comme sensibilisateurs de ce phénomène, montrent la possibilité de transferts d'énergie électromagnétique du système pigmentaire II vers le système I. L'étude cinétique de l'émission de fluorescence révèle une réduction indirecte par l'hydrogène du substrat de la photoréaction II. Cette réduction a pour effet de stimuler particulièrement l'émission de fluorescence à 685, 750 mμ, attribuée au système II. Un mécanisme de régulation des transferts d'énergie du système II au système I, basé sur l'état des pièges photochimiques, est présenté.

SUMMARY

An electrochemical method for the simultaneous measurement of the relative rates of photosynthetic O_2 and CO_2 exchanges in small algal samples is described. The first products of $^{14}CO_2$ fixation are identical for photosynthesis and for photoreduction under H_2 gas in Scenedesmus. *The site of inhibition by* 3-(4-*chlorophenyl*)-1, 1-*dimethylurea (CMU) of photosynthetic O_2 evolution in* Chlorella *is shown to be a thermal step between the two photochemical reactions. This thermal step is close kinetically to the substrate of photoreaction II. Photoreduction appears to require the only functionning of photoreaction I. This follows from its insensitivity to CMU and from its lack of the dichromatic enhancement effect. The action spectra of photoreduction in* Scenedesmus *and in* Porphyridium *and the relative efficiencies of various pigments as sensitizers of photoreduction show the possibility of energy transfer from pigment system II to system I. A kinetic study of the initial fluorescence yield suggests that H_2 gas reduces indirectly the substrate of photoreaction II. This reduction leads to a relatively higher fluorescence yield at 685, 750 mμ attributed to system II. A regulatory mechanism for energy transfer from system II to system I is discussed.*

I. INTRODUCTION

La photosynthèse, ou l'utilisation de l'énergie lumineuse par des organismes biologiques aux fins d'édification de la matière vivante, revêt différentes formes. La forme la plus commune chez les végétaux s'accompagne de dégagement d'oxygène et d'absorption de gaz carbonique. On trouvera commode d'appeler « photosynthèse aérogène » ce phénomène particulier. Depuis longtemps on sait que, chez les bactéries, la photosynthèse ne s'accompagne d'aucun dégagement d'oxygène et fréquemment d'aucune absorption de gaz carbonique.

GAFFRON (1940, 1944) fut le premier à déceler chez des végétaux des formes de photosynthèse apparentées au type bactérien. Certaines algues, placées dans une atmosphère d'hydrogène et de gaz carbonique, peuvent absorber ces deux gaz à la lumière pendant plusieurs heures, sans dégagement d'oxygène. Ce type de photosynthèse, déjà connu chez les bactéries pourpres, a été appelé « photoréduction » par GAFFRON (1940). D'après cet auteur, la stoechiométrie de cette réaction est :

$$2H_2 + CO_2 \xrightarrow{h\nu} (CH_2O) + H_2O \ .$$

Abréviations

ADP et ATP : adénosine di- et triphosphate.

C673, C683 et C700 : holochromes à chlorophylle *a*, définis par leurs maximums d'absorption dans le rouge.

CMU : 3 - (4-chlorophényl)-1, 1-diméthylurée.

DCMU : 3-(3,4-dichlorophényl)1, 1-diméthylurée.

E^+ et E : formes oxydée et réduite d'une entité correspondant aux centres photochimiques d'EMERSON et ARNOLD (1932*b*). Cette entité a été utilisée par JOLIOT (1961) pour rendre compte du rapport $\frac{O_2 \text{ dégagé}}{\text{chlorophylle}}$ après un éclair isolé.

NAD et $NADH_2$: formes oxydée et réduite de la nicotinamide adénine dinucléotide.

NADP et $NADPH_2$: formes oxydée et réduite de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

P700 : oxydo-réducteur présent chez les végétaux photosynthétiques et probablement effecteur de la photoréaction I. La différence du spectre de la forme oxydée et de celui de la forme réduite présente un minimum à 700 mμ (KOK et HOCH, 1961). La réaction photochimique I consiste en une oxydation de P700.

Q et QH : formes oxydée et réduite d'un extincteur (« quencher ») photochimique de fluorescence. Cette entité a été introduite par DUYSENS (1963) pour expliquer les variations à la lumière du rendement de fluorescence chez les végétaux photosynthétiques. Seule la forme oxydée (Q) éteint la fluorescence. Q correspond probablement à l'effecteur de la photoréduction II. La réaction photochimique II consiste en une réduction de Q.

vpM : volumes par million.

Certaines algues, comme *Chlamydomonas* et *Scenedesmus*, posséderaient une hydrogénase constitutive, l'activité hydrogénasique y apparaissant après environ 10 mn d'incubation sous atmosphère anoxique (FRENKEL et LEWIN, 1954 ; GOLDSBY, 1961). D'autres, certaines espèces de *Chlorella* par exemple, semblent posséder une hydrogénase inductible (KESSLER et *al.*, 1963). Ce conditionnement des algues à la photoréduction a été appelé « adaptation à l'hydrogène » et la réaction inverse, « désadaptation ». L'adaptation chez *Scenedesmus* semble consister en une réduction de certaines fonctions disulfures de l'hydrogénase plutôt qu'en une synthèse enzymatique (GOLDSBY, 1961 ; HARTMANN et KRASNA, 1964).

Une autre réaction, découverte par GAFFRON (1942*b*, 1944) chez *Scenedesmus*, rapproche cette espèce des bactéries chimiosynthétiques comme *Hydrogenomonas*, c'est la « réaction oxhydrogène ». Cette réaction sombre consiste en une absorption d'hydrogène, de gaz carbonique et d'oxygène, lorsque la tension partielle du dernier gaz est assez faible. La stoechiométrie de cette réaction est (GAFFRON, 1942*b*) :

a) $4H_2 + 2O_2 \longrightarrow 4H_2O$

b) $2H_2 + CO_2 \longrightarrow (CH_2O) + H_2O$

Comme les bactéries photosynthétiques, diverses espèces d'algues sont capables de photo-assimilation de substrats organiques. C'est le cas de *Scenedesmus* pour le glucose (BISHOP, 1961). C'est aussi celui de *Chlamydobotrys*, incapable de photosynthèse aérogène mais utilisant très efficacement l'acétate à la lumière (PRINGSHEIM et WIESSNER, 1960).

L'existence, chez le même organisme, des diverses formes de photosynthèse en facilite la comparaison précise. Cette comparaison est susceptible de contribuer puissamment à la compréhension du mécanisme photosynthétique. Dans ce travail, on s'est attaché surtout à l'étude des modalités de l'absorption de l'énergie lumineuse et des mécanismes de sa transformation en énergie chimique. Plus spécifiquement on a cherché à déterminer la nature des pigments qui sensibilisent photosynthèse aérogène et photoréduction, le mode d'action d'un inhibiteur du dégagement d'oxygène sans effet sur la photoréduction, et la nature des étapes initiales de la fixation du gaz carbonique. A cet effet, on a employé des espèces d'algues unicellulaires capables de photosynthèse aérogène et de photoréduction : *Chlorella pyrenoidosa*, souche EMERSON (KESSLER et *al.*, 1963) *Scenedesmus obliquus* (GAFFRON, 1940) et *Porphyridium cruentum* (FRENKEL et RIEGER, 1951).

II. TECHNIQUES

1. MATÉRIEL BIOLOGIQUE

Chlorella pyrenoidosa, souche EMERSON, a été cultivé dans du milieu de TAMIYA additionné des solutions d'oligoéléments A_5 et B_6 d'ARNON d'après MOYSE et *al.* (1956). Les autres conditions de culture étaient : température 25 °C, éclairement de 8 000 lx fourni par des tubes fluorescents, barbotage d'un mélange à 4 % de CO_2 dans l'air. Les algues étaient récoltées quotidiennement.

Scenedesmus obliquus, souche employée dans le laboratoire de CALVIN, a été cultivé « axéniquement » (c'est-à-dire en l'absence de tout autre organisme) selon deux méthodes.

a) Pour les études du métabolisme du carbone, on a utilisé une culture de densité constante dans du milieu de MYERS (1947), selon la technique décrite par BASSHAM et CALVIN (1957). Cette culture a été faite dans les conditions suivantes : température 20 °C, éclairement de 30 000 lx fourni par des tubes fluorescents, barbotage d'un mélange à 4 % de CO_2 dans l'air.

b) Pour les autres expériences, la même souche (gracieusement fournie par le laboratoire du Professeur CALVIN) a été cultivée à 22 °C avec un éclairement de 4 000 lx provenant de tubes fluorescents et un barbotage d'un mélange CO_2 - air à 2 %. On a employé le milieu de MYERS (1947) modifié par BASSHAM et CALVIN (1957). La récolte était faite tous les trois jours.

Porphyridium cruentum NAEGELI a été obtenu de la Collection d'Algues de l'Université de l'Indiana (n° 161 du catalogue STARR, 1964). Cette algue rouge a été cultivée « axéniquement » dans du milieu de JONES pH 7,6 (JONES et *al.*, 1963) à 20 °C, à 4 000 lx (tubes fluorescents) avec barbotage d'un mélange CO_2 - air à 2 %. On récoltait tous les quatre jours.

2. SÉPARATION ET IDENTIFICATION DE MÉTABOLITES MARQUÉS

Les produits de fixation du $^{14}CO_2$ par *Scenedesmus obliquus* ont été obtenus par extraction alcoolique : 2 fois à 60 °C par le méthanol à 80 % (v/v) dans l'eau, puis deux fois à la température ambiante par le méthanol à 20 %.

Ces extraits ont ensuite été réunis, évaporés et chromatographiés en deux dimensions sur papier selon la technique décrite par BASSHAM et CALVIN (1957). Le papier (WHATMAN, n° 4) était lavé au préalable à l'acide oxalique à 0,5 %. On a employé pour la première dimension : le mélange phénol-eau, 72 - 28 (en masse) et pour la seconde : le mélange *n*-butanol-acide propionique - eau, 45 - 32 - 23 (en volume) fraîchement préparé. Les taches étaient révélées par autoradiographie sur pellicule à émulsion sensible aux rayons X et identifiées par cochromatographie avec des échantillons de synthèse.

La radioactivité due au ^{14}C des taches chromatographiques était mesurée par comptage direct sur le papier à l'aide d'un compteur de type GEIGER-MÜLLER comportant une cellule à courant gazeux et à fenêtre mince formée d'une membrane de « Mylar » (DUPONT de NEMOURS).

3. MESURE DE LA FLUORESCENCE *IN VIVO*

Les études de fluorescence ont été effectuées à l'aide de l'appareil de LAVOREL (1962, 1965*a*). En voici une brève description. Un volume d'environ 250 ml d'une suspension d'algues où barbotent des gaz de composition voulue est agité magnétiquement dans un réservoir. Cette suspension est pompée par intermittences dans un capillaire, puis ramenée dans le réservoir. Une section du capillaire est éclairée par de la lumière colorée provenant d'un monochromateur. La lumière réémise sous forme de fluorescence est analysée à angle droit par un autre monochromateur, puis mesurée par un photomultiplicateur dont le courant est amplifié et enregistré. Le régime d'écoulement intermittent permet d'obtenir de façon continue les valeurs de deux des phases principales de la courbe d'induction de fluorescence. Il réalise ainsi l'équivalent de plusieurs expériences par minute, avec à chaque fois un échantillon différent. La phase d'écoulement à vitesse réglable

permet d'obtenir un minimum de fluorescence dont la valeur donne une mesure très approchée du niveau initial de fluorescence *O*. Durant la phase d'arrêt on obtient un maximum de fluorescence qui peut atteindre le niveau *P* si le temps d'arrêt est suffisant. Le niveau *S* s'obtient par un arrêt prolongé de la circulation (fig. 23).

La suspension, normalement maintenue à l'obscurité, peut être soumise, avant l'analyse de fluorescence, à une préillumination actinique courte (mode Ac), qui se fait dans une cavité spéciale aménagée dans le capillaire et dure $2{,}5 \cdot 10^{-2}$ s. Cette préillumination a lieu $1{,}4.10^{-2}$ s avant l'analyse.

4. MESURE DES SPECTRES D'ACTION

La source de lumière colorée était un monochromateur à réseau (Bausch and Lomb, distance focale de 500 mm) muni d'une lampe à ruban de tungstène de 110 W. L'image du réseau était concentrée sur l'objet à éclairer (de 5 à 10 mm de diamètre suivant les cas). On s'est servi d'une thermopile Volochine en circuit potentiométrique pour les mesures d'énergie aux diverses longueurs d'onde.

Pour la mesure des spectres d'action on a eu soin de faire, avant chaque spectre, une courbe de la réponse obtenue, en fonction de l'intensité lumineuse, à la longueur d'onde la plus efficace pour le phénomène observé (par exemple, pour le dégagement d'oxygène, 675 mμ chez les algues vertes et 565 mμ chez les algues rouges). L'intensité lumineuse était contrôlée par des filtres neutres métallisés. La courbe d'intensité obtenue, on fermait les fentes verticales du monochromateur de manière à ce que la réponse se situe bien sur la portion linéaire de la courbe à cette longueur d'onde. Le spectre d'action se calculait ensuite en ramenant la réponse pour chaque longueur d'onde à l'unité quantique incidente.

Au cours de l'expérience, qui peut durer plusieurs heures, on mesure à intervalles réguliers, la déflection produite par une longueur d'onde repère (par exemple, 675 mμ), de façon à pouvoir suivre le changement éventuel de l'activité des organismes. On tient compte de ce changement d'activité pour le calcul du spectre d'action.

Une précaution essentielle est l'emploi de couches d'organismes aussi minces que possible. A défaut de cette précaution, les cellules forment écran les unes pour les autres, de manière variable suivant la longueur d'onde de la lumière incidente. Cela a pour effet de déformer les spectres de sorte que la proportionnalité entre l'action et l'absorption par les pigments actifs n'est pas respectée.

5. MESURE DES ÉCHANGES GAZEUX

A. Préparation des mélanges gazeux

Les mélanges gazeux employés dans ce travail ont été réalisés soit en usine, soit au laboratoire. Dans ce dernier cas, on ajustait le débit des deux gaz à mélanger dans les proportions voulues à l'aide de manodétendeurs à triple détente, les débits étant mesurés à l'aide de débitmètres à flotteurs Houdec. L'hydrogène était débarrassé des traces d'oxygène (moins de 5 vpM) qu'il contenait par passage sur un catalyseur « Deoxo ».

B. Mesure de l'oxygène

Les mesures d'oxygène ont été effectuées par la méthode polarographique avec une cathode en platine et une électrode impolarisable de Ag/AgCl. La tension

appliquée entre les deux électrodes est de 0,7 V ce qui correspond au palier de réduction de l'oxygène. L'électrolyte est du KCl 0,1 M. Un galvanomètre enregistreur (SEFRAM, « Graphispot ») est placé en série, entre les deux électrodes. Le courant qui résulte de la réduction de l'oxygène est proportionnel à la concentration de ce gaz dans le milieu. Le circuit électrique employé est de type classique (HAXO et BLINKS, 1950). Cette technique donne normalement la concentration absolue d'oxygène et fut appliquée à l'étude de la photosynthèse dès 1938 par BLINKS et SKOW (1938).

Une modification particulièrement adaptée au présent travail a été introduite par HAXO et BLINKS (1950). Cette modification porte sur la cuve de mesure qui au lieu d'être une enceinte fermée est ici, au contraire, ouverte sur un milieu extérieur. Les algues sont plaquées contre l'électrode de platine par une membrane à dialyse et baignent, à travers cette dernière, dans un grand volume de solution agitée. Cette solution est maintenue en homéostasie complète au point de vue pH, température et composition ionique et gazeuse.

A cause de la diffusion à travers la membrane, la concentration gazeuse au niveau des algues tend vers un état stationnaire régi par :

1° les échanges à travers la membrane ;

2° la réduction de l'oxygène par l'électrode ;

3° les échanges biologiques des algues.

Lorsque la vitesse de ces derniers est constante, la concentration d'oxygène dans la cuve de mesure atteint une valeur constante, proportionnelle à la vitesse des échanges biologiques. A l'obscurité, lorsque la vitesse de la respiration est constante, le courant enregistré, invariable en fonction du temps, est plus faible que le courant de zéro de l'appareil mesuré en l'absence d'algues. A la lumière, pour une vitesse constante de dégagement d'oxygène, le courant est constant et supérieur au courant obscur. La différence entre les courants à la lumière et à l'obscurité constitue une mesure relative de la vitesse du dégagement photosynthétique d'oxygène.

Dans ce travail, deux versions de ce type d'appareil ont été utilisées : l'électrode nue pour les transitoires rapides et l'électrode à membrane (CLARK et *al.*, 1953 ; FORK, 1963). Le montage inclut un réservoir thermorégularisé contenant un milieu convenable qui accomplit un circuit fermé entre l'appareil de mesure d'oxygène et le réservoir. Ce système qui sera décrit plus loin (fig. 5) est inspiré de celui de FORK (1963).

C. Mesure du gaz carbonique

BLINKS et SKOW (1938) furent les premiers à utiliser l'électrode de verre pour les mesures de changements d'acidité dus principalement aux échanges photosynthétiques de gaz carbonique. La méthode fut étudiée par ROSENBERG (1954) et employée par GAFFRON et ROSENBERG (1955) pour des mesures quantitatives d'absorption photosynthétique de CO_2 chez les algues suspendues dans des solutions de bicarbonate.

La principale difficulté de cette méthode réside dans le fait qu'elle n'est quantitative que pour des solutions de bicarbonate rigoureusement pures. Les phosphates, par exemple, doivent en être exclus. Un moyen de pallier cette difficulté est d'interposer une membrane perméable aux gaz, mais imperméable aux ions entre l'électrode de verre et la solution à mesurer. C'est ce que firent STOW et *al.* (1957) pour

des mesures de CO_2 sanguin. La méthode fut étudiée et améliorée par SEVERINGHAUS et BRADLEY (1958) et par HERTZ et SIESJÖ (1959).

Principe de la méthode

Il repose sur la variation de pH d'une solution de bicarbonate en fonction de la tension partielle de CO_2 dissous. Cette fonction peut être explicitée à l'aide du système suivant :

Relations d'équilibre du CO_2 :

$$CO_2d + H_2O \overset{K_H}{\rightleftarrows} H_2CO_3, \qquad \text{où } CO_2d = CO_2 \text{ dissous} \tag{1}$$

$$H_2CO_3 \overset{K_1}{\rightleftarrows} H^+ + HCO_3^- \tag{2}$$

$$HCO_3^- \overset{K_2}{\rightleftarrows} H^+ + CO_3^{--} \ . \tag{3}$$

Equilibre de dissociation de l'eau :

$$H_2O \overset{K_{H_2O}}{\rightleftarrows} H^+ + OH^- \tag{4}$$

et principe de neutralité électrique de la solution :

$$HCO_3^- + 2CO_3^{--} + OH^- = Na^+ + H^+ \ . \tag{5}$$

On a représenté ici le cas du $NaHCO_3$ mais il est bien évident que la relation vaut aussi bien pour n'importe quel cation monovalent autre que Na^+. Dans les calculs qui suivent les parenthèses symbolisent des *activités*.

Des relations (1) et (2) on tire :

$$(HCO_3^-) = \frac{K_1 K_H (CO_2)d}{(H^+)} \ .$$

Si l'on substitue cette valeur en (3) on obtient :

$$(CO_3^{--}) = \frac{K_1 K_2 K_H (CO_2)d}{(H^+)^2} \ .$$

En reportant ces valeurs en (5) et en remplaçant (OH^-) par sa valeur $\frac{K_{H_2O}}{(H^+)}$

on a : $$(CO_2)d = \frac{(H^+)^2 + (H^+)(Na^+) - K_{H_2O}}{\frac{2K_1K_2K_H}{(H^+)} + K_1K_H} \ . \tag{6}$$

Expérimentalement les valeurs de K_1 et de K_H sont connues avec moins de précision que la constante apparente K_1^a qui correspond à l'équilibre global ci-dessous où $[CO_2 d + H_2CO_3]$ est considéré comme une seule espèce :

$$[CO_2 d + H_2CO_3] \underset{\longleftarrow}{\overset{K_1^a}{\longrightarrow}} H^+ + HCO_3^- \quad . \tag{7}$$

Cela est dû à la difficulté de distinguer entre les espèces CO_2 dissous et H_2CO_3. Il serait donc préférable de faire figurer K_1^a dans l'équation (6).

Des relations (1), (2) et (7) on tire :

$$K_1 K_H = K_1^a (1 + K_H) \quad .$$

La constante d'hydratation K_H a une valeur très petite devant 1 (environ $2 \cdot 10^{-3}$ — BRINKMAN et coll., 1933) et peut donc être négligée ; ce qui donne :

$$K_1^a = K_1 K_H \quad .$$

Remplaçons $K_1 K_H$ dans l'équation (6) par K_1^a :

$$\boxed{(CO_2)d = \frac{(H^+)^3 + (H^+)^2(Na^+) - K_{H_2O}(H^+)}{K_1^a[2K_2 + (H^+)]}} \tag{8}$$

Voici les valeurs adoptées pour les constantes d'équilibre à 25 °C :

$K_{H_2O} = 1 \cdot 10^{-14}$

$K_1^a = 4{,}37 \cdot 10^{-7}$ (HARNED et DAVIS, 1943).

$K_2 = 4{,}68 \cdot 10^{-11}$ (HARNED et SCHOLES, 1941).

La famille de courbes de la figure 1 matérialise des calculs numériques faits en portant diverses valeurs de (Na^+) et de (H^+) dans l'équation (8). La notation pH étant commode, nous avons représenté le logarithme du (CO_2) dissous en fonction du pH.

La définition adoptée ici est $pH = - \lg (H^+)$ (BATES, 1964 ch. 2).

Il est évident que ces calculs ne s'appliquent qu'aux activités des différentes espèces. Cependant, pour les solutions de faible force ionique, on pourra en première approximation assimiler concentrations à activités, le coefficient d'activité γ étant dans ce cas, voisin de 1,0.

Puisqu'il s'agit dans ce travail de mesurer un changement de tension de CO_2 par une variation de pH, il convient de s'assurer :

1° qu'on opère au maximum de sensibilité possible,

2° et surtout que cette sensibilité est constante dans la région de pH où l'on opère.

C'est donc le comportement de la sensibilité vis-à-vis des différents facteurs qui la régissent que nous allons maintenant étudier. La sensibilité peut se définir (SEVERINGHAUS et BRADLEY, 1958) comme le changement de pH correspondant à une variation de lg (CO_2) dissous :

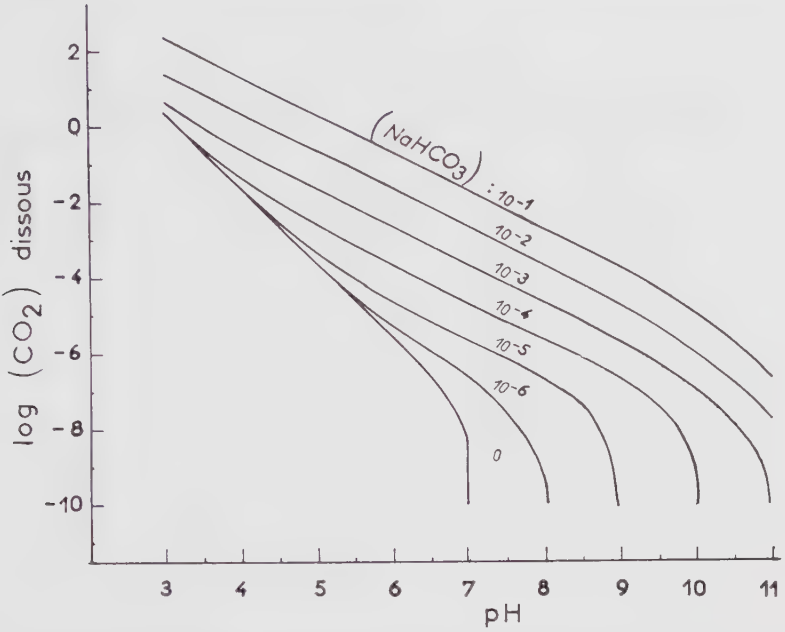


FIG. 1. — Famille de courbes représentant la variation théorique à 25 °C du logarithme de la tension partielle du CO_2 dissous en fonction du pH, dans des solutions de $NaHCO_3$ d'activités différentes. Valeurs calculées à partir de l'équation (8).

$$\frac{\Delta \text{ pH}}{\Delta \text{ lg } (CO_2)d} .$$

Dans le cas présent, la sensibilité S sera définie comme suit :

$$S = -\frac{\delta \text{ pH}}{\delta \text{ lg } (CO_2)d} \quad (Na^+) \text{ étant constante.}$$

Et puisque :

$$\frac{\text{pH}}{\text{lg } (CO_2)d} = \frac{L\left(\frac{1}{H^+}\right)}{L(CO_2)d}$$

on peut écrire :

$$S = \frac{dL(H^+)}{dL(CO_2)d} = \frac{dL(H^+)}{d(H^+)} \frac{d(H^+)}{dL(CO_2)d}$$

$$S = \frac{1}{(H^+)} \frac{d(H^+)}{dL(CO_2)d} .$$

En prenant le logarithme des deux membres de l'équation (8) et en calculant la dérivée on obtient :

$$\frac{dL(CO_2)d}{d(H^+)} = \frac{2(H^+)^3+[6K_2+(Na^+)](H^+)^2+4K_2(Na^+)(H^+)-2K_2K_{H_2O}}{[(H^+)+2K_2][(H^+)^3+(H^+)^2(Na^+)-(H^+)K_{H_2O}]}$$

L'expression de la sensibilité devient :

$$S = \frac{1}{(H^+)} \frac{[(H^+)+2K_2][(H^+)^3+(H^+)^2(Na^+)-(H^+)K_{H_2O}]}{2(H^+)^3+[6K_2+(Na^+)](H^+)^2+4K_2(Na^+)(H^+)-2K_2K_{H_2O}}$$

$$\boxed{S = \frac{(H^+)^3+[2K_2+(Na^+)](H^+)^2+[2K_2(Na^+)-K_{H_2O}](H^+)-2K_2K_{H_2O}}{2(H^+)^3+[6K_2+(Na^+)](H^+)^2+4K_2(Na^+)(H^+)-2K_2K_{H_2O}}} \quad (9)$$

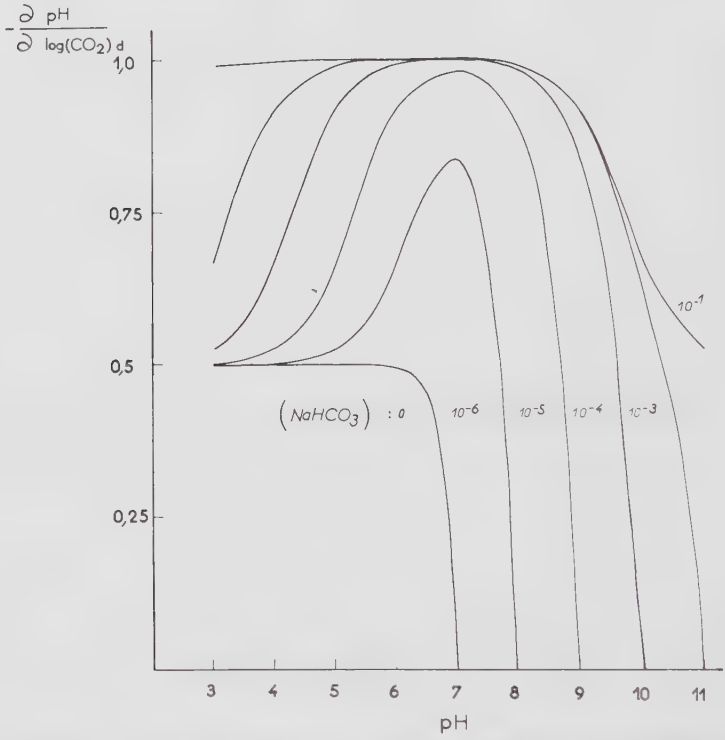


FIG. 2. — Famille de courbes représentant la variation théorique à 25 °C de la sensibilité $\left(\frac{\delta\ pH}{\delta\ \log (CO_2)d}\right)$ en fonction du pH, avec des solutions de $NaHCO_3$ d'activités différentes. Valeurs calculées à partir de l'équation (9).

Portons diverses valeurs de (H^+) et de (Na^+) dans l'équation (9), en utilisant les valeurs déjà citées pour les constantes d'équilibre. On obtient de la sorte une série de courbes figurant la variation de la sensibilité en fonction du pH pour diverses valeurs de (Na^+) (fig. 2).

Pour l'eau pure, la sensibilité est de 0,5 entre pH 3 et 6. A mesure qu'augmente la concentration de bicarbonate, la sensibilité croît et atteint la valeur de 1,0 pour des activités en Na^+ supérieures à 10^{-4}, dans les limites de pH définies par la figure 2.

Dans le cas de $(Na^+) = 10^{-4}$ ou 10^{-3}, valeurs qui nous intéressent particulièrement, la sensibilité est comprise entre 0,98 et 1,0, dans les zones de pH 5,6 - 8,0 et 4,7 - 8,3 respectivement.

Description du montage

L'appareil utilisé fonctionne d'après les principes déjà énoncés et permet la mesure simultanée de l'oxygène et du gaz carbonique. Les deux mesures font appel

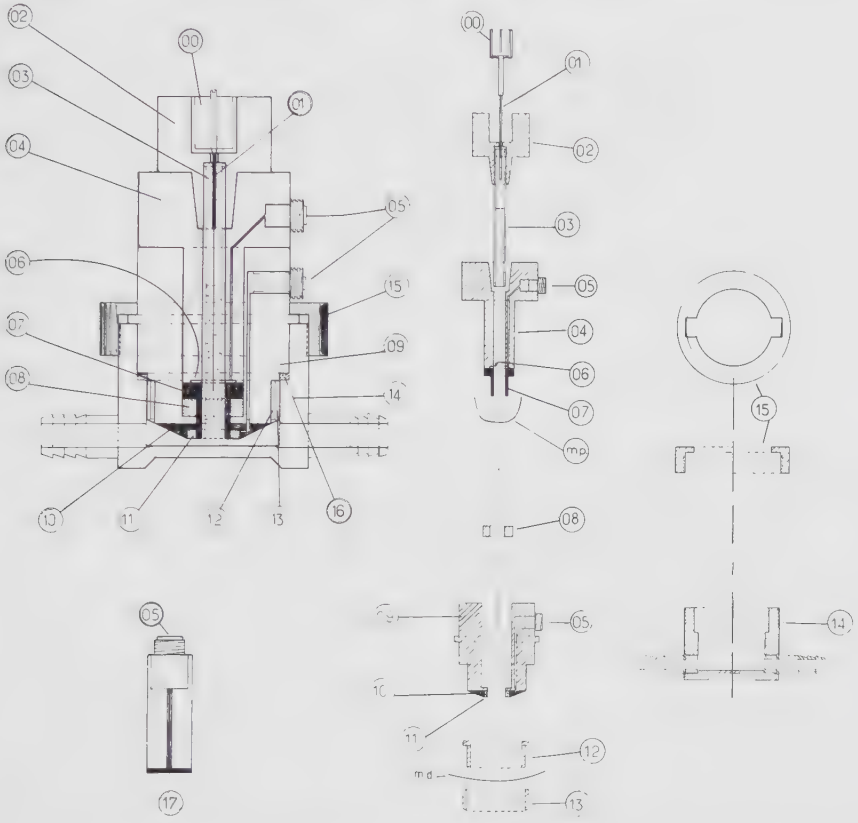


FIG. 3. — Plan détaillé du dispositif de mesures simultanées des vitesses d'échanges d'O_2 et de CO_2 ; réalisé en polymétacrylate.
00 et 05 : prises électriques,
01 : électrode interne de référence Ag/AgCl portée par le bouchon 02,
03 : électrode de verre,
04 : manchon contenant l'électrode de verre 03 et l'électrode externe de référence Ag/AgCl 06 ; extrémité 07 en polymétacrylate noir,
08 : bague de polytétrafluoroéthylène fixant la membrane de polytétrafluoroéthylène *m.p.* sur l'extrémité du manchon 04,
09 : pièce à extrémité 10 noire porteuse de l'anneau de platine 11,
12 et 13 : bagues servant à maintenir la membrane à dialyse *m.d.* contre l'extrémité de la pièce 09,
14 : cuve à fond transparent où circule le milieu physiologique,
15 : anneau de serrage assurant, grâce au joint 16, l'étanchéité de la cuve,
17 : électrode de référence Ag/AgCl baignant dans le milieu de circulation et servant à la mesure ampérométrique de l'O_2.

au principe des états stationnaires et donnent des valeurs proportionnelles à la vitesse du phénomène étudié, à tout le moins quand celle-ci est constante. L'ensemble du dispositif est réalisé en polymétacrylate (« plexiglas »).

La pièce 9 (fig. 3) est porteuse d'un anneau de platine (11) servant de cathode dans les mesures d'O_2 ; l'électrode impolarisable Ag/AgCl (pièce 17) plonge dans le milieu de circulation de façon à pouvoir en être facilement retirée lorsqu'on veut éviter les effets biologiques possibles de l'ion Ag^+ (fig. 5). Au cours de ce travail elle n'a été présente que pour les mesures simultanées d'O_2 et de CO_2.

Les vitesses des échanges de gaz carbonique sont mesurées par une modification d'une méthode déjà décrite (GINGRAS, 1963). Une électrode de verre à bout plat (03) et une électrode de référence Ag/AgCl pariétale (06) sont contenues dans un manchon (pièce 04) et baignent dans une solution diluée de $NaHCO_3$ et de KCl. Le bout de ce manchon est en polymétacrylate noir de façon à protéger de la lumière l'électrode de référence pariétale. La pièce 02 porte l'électrode de référence (Ag/AgCl) interne. Une couche de la solution $NaHCO_3$-KCl est maintenue contre la membrane de verre de l'électrode par une pellicule (6 μ d'épaisseur) de polytétrafluoroéthylène (m.p.) perméable aux gaz mais non aux ions. Cette membrane est rendue solidaire du manchon (04) par une bague (08) de polytétrafluoroéthylène. Le manchon (04)

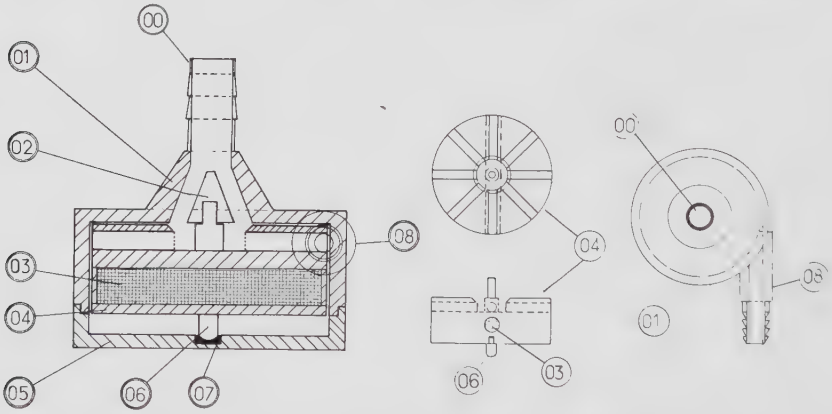


FIG. 4. — Plan détaillé de la pompe centrifuge réalisée en polymétacrylate.
00 : arrivée axiale du liquide,
01 et 05 : pièces formant boîtier étanche,
02 : support de l'axe du rotor 04,
03 : barreau aimanté inclus au centre du rotor 04,
04 : rotor percé de 8 canaux radiaux servant à la centrifugation du liquide,
06 : axe d'acier chromé pivotant sur le coussinet de rubis 07,
08 : sortie latérale du liquide au niveau des canaux radiaux.

s'adapte dans la pièce (09). Une membrane à dialyse (m.d.) coincée entre deux anneaux (pièces 12 et 13) forme ainsi le fond d'un godet où est versée la suspension d'algues. Ce godet comporte une fuite latérale permettant la sortie de l'air et de l'excès de la suspension. Une fois ce godet chargé de la suspension, la pièce 09 y est enfoncée ce qui a pour effet d'interposer les algues entre les électrodes et la membrane à dialyse. L'ensemble s'adapte dans une cuve (14) à fond mince et transparent (ce qui permet d'illuminer les algues) où circule un milieu approprié. Ce milieu accomplit un circuit fermé entre la cuve et un réservoir (fig. 5) thermorégularisé, où barbotent des gaz de composition voulue, et contenant des sections de

tube de verre (non figurées) pour augmenter la surface de contact entre le gaz et le liquide. La circulation est assurée par une pompe centrifuge en polymétacrylate (fig. 4 et 5) entraînée magnétiquement par un moteur synchrone.

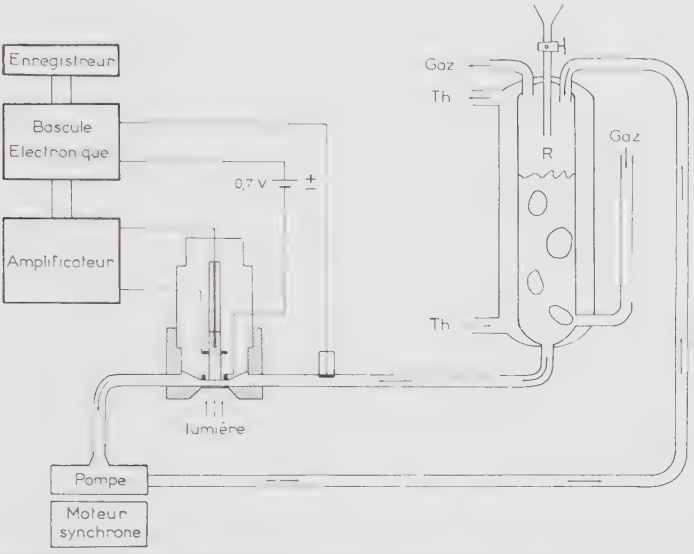


FIG. 5. — Schéma général du dispositif de mesure des vitesses d'échanges d'O_2 et de CO_2.
Th : eau thermorégularisée servant à maintenir constante la température du milieu physiologique. Le circuit électrique comporte une bascule électronique permettant l'enregistrement alterné des tensions d'O_2 et de CO_2.

La pile employée pour les mesures est la suivante :

$$\mathrm{Ag}\,|\,\mathrm{AgCl}\,|\,\begin{matrix}\mathrm{NaHCO_3\ 10^{-3}M}\\ \mathrm{KCl\ 0{,}1\ M}\end{matrix}\,\|\,\mathrm{Verre}\,\|\,\mathrm{KCl\ 0{,}1\ M}\,|\,\mathrm{AgCl}\,|\,\mathrm{Ag}.$$

Cette disposition minimise les potentiels de jonction puisqu'elle ne comporte pas de jonction liquide-liquide. Les différences de potentiel entre les deux électrodes de référence sont mesurées à l'aide d'un amplificateur à courant continu (LEMOUZY « Multidyne ») de résistance d'entrée de l'ordre de 10^{15} Ω. L'appareil est entouré par une cage de Faraday en aluminium reliée à la masse et comportant deux orifices pour le passage de la lumière excitatrice.

L'électrode de verre consiste en une membrane plane de verre CORNING 015 soudée en bout d'un tube de verre de 6 mm de diamètre suivant la méthode de Mac INNES et DOLE (1930). Seules sont retenues les électrodes qui donnent le potentiel théorique (59 mV par unité de pH, à 25 °C) d'après l'équation de NERNST et ont un potentiel d'asymétrie mesuré avec la pile :

$$\mathrm{Ag}\,|\,\mathrm{AgCl}\,|\,\mathrm{HCl\ 0{,}1\ M}\,\|\,\mathrm{Verre}\,\|\,\mathrm{HCl\ 0{,}1\ M}\,|\,\mathrm{AgCl}\,|\,\mathrm{Ag}$$

n'excédant pas quelques millivolts. Un autre critère de sélection est la rapidité des électrodes à atteindre leur potentiel d'équilibre lorsqu'on passe rapidement d'une acidité à une autre. Les électrodes ainsi choisies ont une résistance au courant continu comprise entre 10^8 et 10^9 Ω, mesurée à l'aide d'un potentiomètre électronique (LEMOUZY, « Multimesureur ») de résistance d'entrée de l'ordre de 10^{14} Ω.

Les électrodes Ag/AgCl sont préparées d'après la technique de BROWN et Mac INNES telle que décrite par JANZ (1961).

Etalonnage de la méthode

Les courbes de la figure 1 expriment une relation théorique entre le pH et le lg (CO_2) dissous. Il importait de vérifier expérimentalement cette relation. C'est ce qui a été fait pour les deux solutions :

$NaHCO_3$ 10^{-4} M, KCl 10^{-1} M et $NaHCO_3$ 10^{-3} M, KCl 10^{-1} M .

Ces concentrations en $NaHCO_3$ ont été choisies en vue d'obtenir :

1° une sensibilité constante de 1,0 dans la région de (CO_2) dissous choisie pour le reste de ce travail et,

2° une rapidité de réponse aussi grande que possible : celle-ci varie inversement avec la concentration de bicarbonate (SEVERINGHAUS et BRADLEY, 1958).

On s'est d'abord servi de solutions de pH connu pour étalonner un pH-mètre (RADIOMETER, modèle 22 p). Ensuite on a ajouté du KCl jusqu'à concentration 0,1 M à ces solutions et on a de nouveau mesuré leur pH avec le même appareil. Ces valeurs ont servi à étalonner notre électrode de verre à 25 °C. Les solutions-étalon employées sont : phtalate acide de potassium 0,05 M (pH 4,00) et borate de sodium 0,5 M (pH 9,19) ; les valeurs entre parenthèses sont celles adoptées par le National Bureau of Standards des Etats-Unis à 25 °C. On a aussi utilisé la solution « RADIOMETER » pH 6,50.

Les mélanges gazeux ont été réalisés comme il est décrit plus haut par enrichissement progressif en CO_2 d'un mélange CO_2-air préparé commercialement. D'après l'analyse du fabricant, (AIR LIQUIDE) ce mélange contenait 750 $\pm$ 25 v.p.M. de CO_2.

La variation du pH en fonction de lg (CO_2)*d* a été mesurée à l'aide du montage décrit. Les mélanges gazeux barbotaient dans de l'eau distillée maintenue à 25° C dans le réservoir et accomplissant le circuit indiqué sur la figure 5. Les électrodes de verre étaient étalonnées, quant à leur réponse au pH, au début et à la fin de chaque expérience. Les solutions $NaHCO_3$ - KCl étaient fraîchement préparées à chaque expérience pour éviter une contamination par les métaux alcalins du verre des récipients. Il s'est d'ailleurs avéré nécessaire de renouveler la solution $NaHCO_3$ 10^{-4} M, KCl 10^{-1} M pour chaque point de la courbe correspondante de la figure 6. A défaut de cette précaution une dérive importante se produit (surtout pour les solutions plus riches en CO_2) imputable à la dissolution du verre de l'électrode. Cet effet est d'autant plus important ici que le volume de la pellicule de solution en contact avec le verre est infime.

La teneur en CO_2 dissous a été calculée en tenant compte de la pression partielle du CO_2 gazeux au-dessus du liquide et du coefficient de solubilité de BUNSEN (0,759 à 25 °C) (UMBREIT et *al.*, 1957).

Les résultats de ces expériences sont portés sur la figure 6. Les points représentent les valeurs expérimentales et les courbes en traits pointillés sont celles de la figure 1 ; ces calculs avaient supposé des coefficients d'activité $\gamma = 1{,}0$. Les courbes en trait plein ont été obtenues en employant les coefficients d'activités γ expérimentaux de KIELLAND (1937), pour une solution de force ionique 0,1. Les points expérimentaux se groupent très bien sur cette dernière courbe, en particulier pour $NaHCO_3$ 10^{-3} M dont les valeurs expérimentales sont moins entachées d'erreur, pour les raisons exposées plus haut. Cette concentration a donc été choisie pour toutes les mesures ci-après.

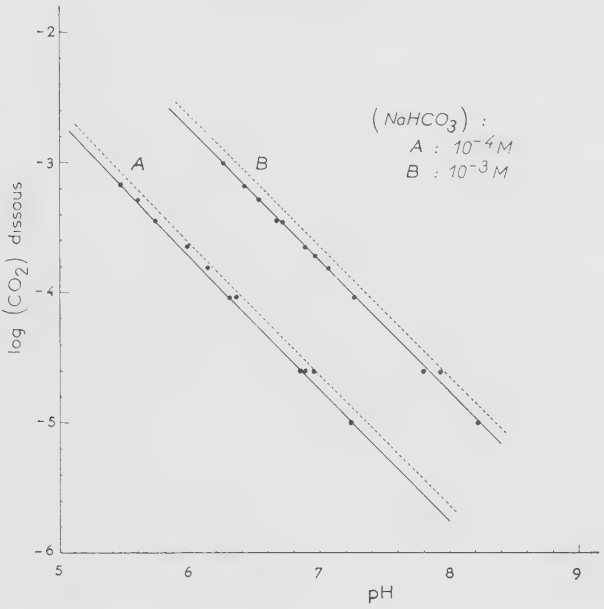


FIG. 6. — Courbes d'étalonnage de la méthode de mesure de la tension de CO_2 avec deux concentrations différentes de $NaHCO_3$ à 25 °C. KCl 0,1M. Les points correspondent aux valeurs expérimentales. Les courbes ont été obtenues à partir de l'équation (8) (voir texte plus haut). Courbes en pointillés : calculées en supposant $\gamma = 1{,}0$. Courbes en traits pleins : calculées d'après les valeurs de γ mesurées par KIELLAND (1937).

Calcul de la vitesse d'absorption de CO_2

D'après ce que l'on vient de voir, il suffit de connaître le pH de la solution de bicarbonate aux états stationnaires de la respiration et de la photosynthèse pour en déduire une quantité qui sera proportionnelle à la différence des vitesses des deux réactions. Cela implique qu'on puisse étalonner la réponse de l'électrode de verre peu de temps avant les mesures de CO_2, puisque les propriétés et donc le potentiel d'asymétrie de la membrane de verre changent au cours du temps. Or, pour les études de la photoréduction, l'électrode doit souvent rester en place pendant une vingtaine d'heures. Cette difficulté peut être évitée grâce à l'artifice suivant : posons que dans la solution de bicarbonate, au niveau de l'électrode de verre,

CO_2^o = (CO_2) à l'obscurité et à l'état stationnaire.
CO_2^L = (CO_2) à la lumière et à l'état stationnaire.
pH^o = pH correspondant à CO_2^o.
pH^L = pH correspondant à CO_2^L.
E^o et E^L = forces électromotrices mesurées entre les deux électrodes de référence, en millivolts pour pH^o et pH^L.

Pour une concentration adéquate de bicarbonate (ici de 10^{-3} M) et une zone de pH déterminée, on a vu que (fig. 2 et 6) :

$$\frac{\Delta\ pH}{\Delta\ lg\ (CO_2)d} = -1{,}0$$

d'où à 25 °C : $pH^o - pH^L = \frac{E^o - E^L}{59} = \lg \frac{CO_2^L}{CO_2^o}$.

La vitesse de l'absorption photosynthétique de CO_2 est proportionnelle à $CO_2^o - CO_2^L$ mais la mesure de pH ne donne que le rapport $\frac{CO_2^L}{CO_2^o}$.

Nous utiliserons donc le rapport :

$$\frac{CO_2^o - CO_2^L}{CO_2^o} = 1 - \frac{CO_2^L}{CO_2^o}$$

qui est lui-même proportionnel à $CO_2^o - CO_2^L$ à condition que CO_2^o soit constant.

On voit que $\frac{CO_2^L}{CO_2^o}$ s'obtient facilement en calculant l'antilogarithme de la valeur $\frac{E^o - E^L}{59}$.

Afin de simplifier les opérations on a construit une abaque portant $E^o - E^L$ en fonction de $\frac{CO^o - CO_2^L}{CO_2^o}$ de façon à trouver facilement cette dernière valeur en partant du ΔE expérimental.

Soulignons que cette relation n'est utilisable qu'à deux conditions.

1° La sensibilité doit être constante. Cette condition est certainement réalisée puisqu'on a opéré aux environs de pH 7,7 à l'obscurité, avec une solution de $NaHCO_3$ 10^{-3} M, et que les variations photosynthétiques n'ont jamais atteint 0,2 d'unité de pH.

2° La seconde condition est que CO_2^o soit constant, et elle est probablement remplie : les expériences ont été faites avec des mélanges gazeux fabriqués en usine et donc de composition invariable. Il ne reste comme source de variation possible que les changements de vitesse de la respiration pour les mesures en aérobiose et de la fermentation pour les mesures en anaérobiose. Cette variation semble avoir été très faible pour toutes nos expériences, la ligne de base des enregistrements à l'obscurité demeurant généralement constante. Au cours de ce travail nous désignerons cette valeur de $\frac{CO_2^o - CO_2^L}{CO_2^o}$ « *Vitesse relative d'absorption de* CO_2 ».

D. **Mesures simultanées des vitesses d'échanges d'oxygène et de gaz carbonique**

Le dispositif qu'on vient de décrire a été utilisé pour des mesures simultanées d'oxygène et de gaz carbonique. Ne disposant pas d'un système d'enregistrement à double piste, j'ai eu recours à une bascule électronique permettant d'enregistrer les deux phénomènes à tour de rôle à intervalles variables. On reconstruit de la sorte, point par point, les deux cinétiques. Chaque voie de la bascule comporte un circuit électrique permettant de faire varier séparément la sensibilité. De plus, le circuit est construit de façon à ce qu'une résistance équivalente à celle du galvanomètre se substitue à celle-ci dans le circuit ampérométrique lorsqu'on enregistre des différences de potentiel. Cette précaution est indispensable si on veut éviter des interruptions dans la polarisation de l'électrode de platine. La figure 7 reproduit une portion

d'un enregistrement ainsi obtenu. Dans cette figure la période de « balayage » est réduite (~ 40 s par cycle) aux fins d'illustration.

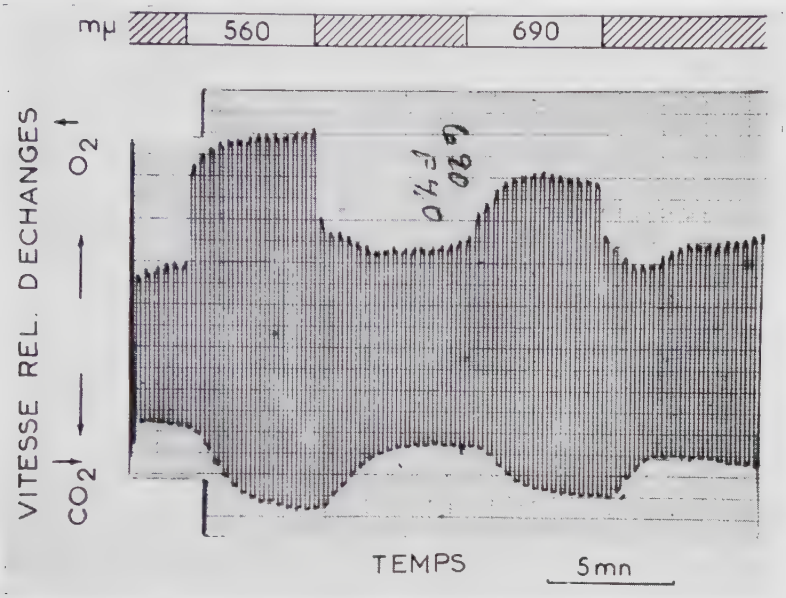


FIG. 7. — Reproduction d'un enregistrement des échanges d'O_2 et de CO_2 chez *Porphyridium*. Succession de périodes d'obscurité et d'illumination à 560 ou à 690 mμ.

Critique de la méthode

Cette méthode présente plusieurs inconvénients. D'abord elle ne permet pas d'obtenir une mesure absolue des vitesses. Ensuite la quantité d'organismes placés dans la cellule de mesure est difficile à déterminer. Ces deux critiques s'appliquent d'ailleurs aussi bien à la méthode de mesure d'O_2 de HAXO et BLINKS (1950). La méthode de mesure du CO_2 photosynthétique souffre en plus d'une chute de sensibilité à mesure que s'élève la tension de CO_2. Cela se produit même pour la zone de pH où la sensibilité est constante. En effet si l'on se reporte à la relation :

$$pH^o - pH^L = \Delta pH = \lg \frac{CO_2^L}{CO_2^o}$$

et si l'on appelle P une valeur de la vitesse stationnaire de la photosynthèse $P = CO_2^o - CO_2^L$, on voit que lorsque CO_2^o croît, le rapport $\frac{CO_2^o - P}{CO_2^o}$ tend vers l'unité et donc que ΔpH tend vers zéro. Pour avoir des différences maximums d'états stationnaires de la concentration de CO_2, on a donc intérêt à employer de faibles tensions de ce gaz avec le danger que cela comporte d'une limitation de la vitesse de la photosynthèse aux fortes intensités lumineuses. Un autre inconvénient est la lenteur relativement grande du temps de réponse du dispositif. Le temps de réponse est beaucoup plus rapide si on élimine la membrane de polytétrafluoroéthylène.

En dépit de ses limitations, la méthode présente beaucoup d'avantages pour le type de mesures qui m'intéresse. Elle permet, notamment, d'utiliser des couches très minces de cellules et par là d'éviter en grande partie l'effet écran qui est une sérieuse source d'erreur pour les mesures de spectres d'action. En pratique, on a employé dans ce travail des couches à peine sensibles à l'œil. Le principe de la concentration stationnaire assure le contrôle rapide, en cours de mesure, de l'obtention de la photosynthèse ou de la photoréduction stationnaire. Dans ce cas, en effet, l'enregistrement donne une horizontale, beaucoup plus facile à apprécier qu'une pente constante obtenue par les mesures de concentration. De plus, les cellules baignant dans un grand volume de milieu de culture, on peut les garder sans dommage dans l'appareil pendant plusieurs jours. Une autre caractéristique, spécialement importante pour les études de la photoréduction, est le renouvellement constant de l'atmosphère gazeuse.

III. MÉCANISMES DE LA RÉDUCTION DU CO_2

1. INTRODUCTION

Depuis les travaux de Calvin et de son équipe, on sait que la principale réaction de carboxylation de la photosynthèse a lieu au niveau du ribulose-1, 5-diphosphate avec production d'acide 3-phosphoglycérique. L'énergie lumineuse sert à la régénération du ribulose diphosphate et à l'accumulation des divers constituants cellulaires. Ce « cycle de réduction du carbone » a été retrouvé chez tous les autotrophes étudiés jusqu'ici (Norris et *al.*, 1955), et en particulier chez les bactéries fixatrices d'hydrogène (Stoppani et *al.*, 1955) et chez les chimiautotrophes (Milhaud et *al.*, 1956) (voir aussi Moyse, 1963*a*). Cependant le travail de Badin et Calvin (1950), portant sur *Scenedesmus* en présence d'hydrogène et à faible intensité lumineuse, indique l'acide malique comme premier produit principal de la fixation du gaz carbonique. Des contacts de 3 - 4 mn avec l'oxygène de l'air à l'obscurité intervenaient entre la fin de ces expériences et la fixation des organismes par l'alcool. Cette méthode pouvant amener des changements importants dans la distribution de la radioactivité, on a jugé nécessaire de reprendre le travail de ces auteurs en évitant tout contact avec l'air avant la fixation des organismes.

2. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

On a appliqué à l'étude de la photoréduction et de la réaction oxhydrogène une des méthodes cinétiques qui ont révélé de manière si élégante la voie du carbone en photosynthèse (Calvin, 1956). Le principe en est le suivant : on donne à l'organisme du $^{14}CO_2$ à la lumière et, au moyen de la radioactivité, on suit son destin au cours du temps dans chacun des produits de la fixation. Au temps initial aucun corps n'est marqué, après un temps très court une seule substance est marquée (dans le cas d'une carboxylation unique), et à mesure que le temps s'écoule, la radioactivité apparaît dans les autres produits à des vitesses d'autant plus grandes qu'ils se situent près de l'étape initiale dans la chaîne.

A mesure que se poursuit l'incorporation, la quantité de ^{14}C augmente dans toutes les substances. Aussi porte-t-on en fonction du temps le rapport de la radio-

activité de chaque substance à la radioactivité totale fixée. On obtient ainsi des courbes de pente négative pour le produit immédiat de la réaction de carboxylation et de pente positive pour les autres produits.

3. CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Une suspension de *Scenedesmus obliquus*, à raison de 2,5 ml d'un culot de centrifugation (15 mn à 600 g) dans 97,5 ml de milieu de culture dilué cinq fois, est agitée dans des flacons hermétiques spéciaux. Ces flacons à fond plat comportent une entrée et une sortie pour les gaz et un orifice fermé par un bout de caoutchouc (« Policeman »), servant aux injections de liquides ou de gaz. Chaque flacon contient 4,0 ml de suspension à pH 7,0 et à 22 - 23 °C sous un volume gazeux de 55 ml.

Avant les expériences, toutes les algues sont adaptées à l'hydrogène à l'obscurité pendant 7 h, dans un courant d'hydrogène contenant 1 % de gaz carbonique. A la fin de la période d'adaptation, la composition du courant gazeux reste la même pour l'étude de la photoréduction ou bien est modifiée pour l'étude de la photosynthèse (1 % de gaz carbonique dans l'air). Ensuite, on illumine les algues pendant 5 mn à l'intensité choisie pour l'expérience, pour permettre à la photosynthèse et à la photoréduction d'atteindre leur état stationnaire. Puis, toujours à la lumière, on introduit dans le flacon 200 μc (7,8 μmoles) de $NaH^{14}CO_3$ à l'aide d'une seringue à tuberculine qu'on utilise de nouveau pour prélever et pour fixer rapidement dans du méthanol des échantillons après des durées variables de fixation. Les produits solubles sont ensuite extraits et analysés comme il est décrit précédemment.

4. RÉSULTATS

La figure 8 montre une cinétique ainsi obtenue au cours de la photosynthèse. Il est clair que le premier produit stable de la photofixation du gaz carbonique est l'acide phosphoglycérique à partir duquel sont formés d'abord les sucres phosphorylés puis les autres composés. Ce résultat permet d'affirmer que nous avons ici affaire au mécanisme décrit par CALVIN.

En photoréduction (fig. 9), on retrouve la même cinétique avec la différence qu'une partie appréciable du gaz carbonique est incorporée dans l'acide malique. Il faut noter aussi que l'apparition de la radioactivité dans l'alanine, l'acide aspartique et l'acide glutamique est nettement plus rapide qu'en photosynthèse aérogène. La figure 10 présente la cinétique obtenue en photoréduction à forte intensité lumineuse et en présence de CMU. Encore une fois, le premier produit de la carboxylation est l'acide 3-phospho - glycérique, et l'alanine est marquée très rapidement. Il est notable toutefois que l'acide malique et les acides aspartique et glutamique sont marqués beaucoup plus lente- ment et beaucoup plus faiblement que dans l'expérience précédente.

En dépit des réserves que l'on peut formuler à l'égard des expériences de BADIN et CALVIN (1950), leurs observations, comme les résultats présents, paraissent s'inscrire dans une courbe continue. A 490 lx, éclairement employé par ces deux auteurs, le premier produit stable de la réaction de carboxylation est l'acide malique. Au fur et à mesure que l'intensité lumineuse augmente (fig. 9 et 10) cette voie cède la place à la carboxylation du ribulose-1, 5-diphosphate.

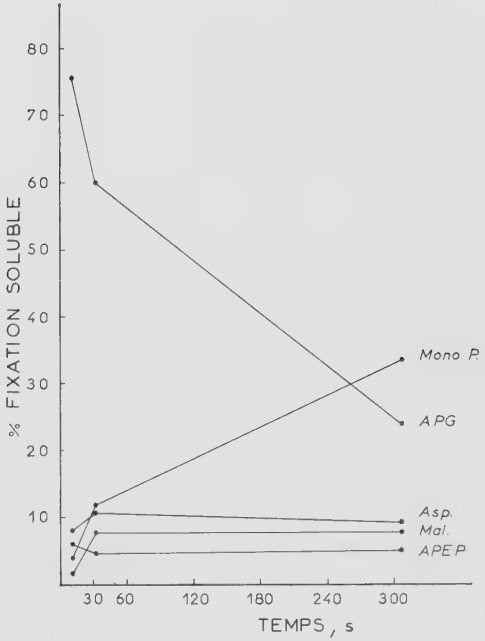


FIG. 8. — Cinétique initiale de la fixation de $^{14}CO_2$ en photosynthèse aérogène chez *Scenedesmus*. Eclairement en lumière blanche, 1 250 lx. Temp. 21-23 °C. Phase gazeuse, air.

APEP : acide 2-phosphoénolpyruvique ; *APG* : acide 3-phosphoglycérique ; *Asp.* : aspartate ; *Mal.* : malate ; *Mono P.* : pentoses et hexoses monophosphorylés.

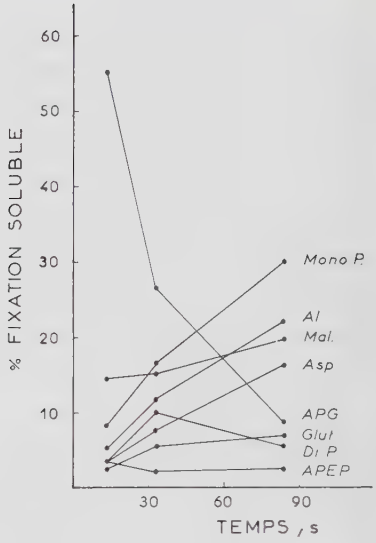


FIG. 9. — Cinétique initiale de la fixation de $^{14}CO_2$ en photoréduction chez *Scenedesmus*. Eclairement en lumière blanche, 1 250 lx. Temp. 21-23 °C. Phase gazeuse, H_2.

Al. : alanine ; *APEP* : acide 2-phosphoénolpyruvique ; *APG* : acide 3-phosphoglycérique ; *Asp.* : aspartate ; *Di P.* : pentoses et hexoses diphosphorylés ; *Glut.* : glutamate ; *Mal.* : malate ; *Mono P.* : pentoses et hexoses diphosphorylés.

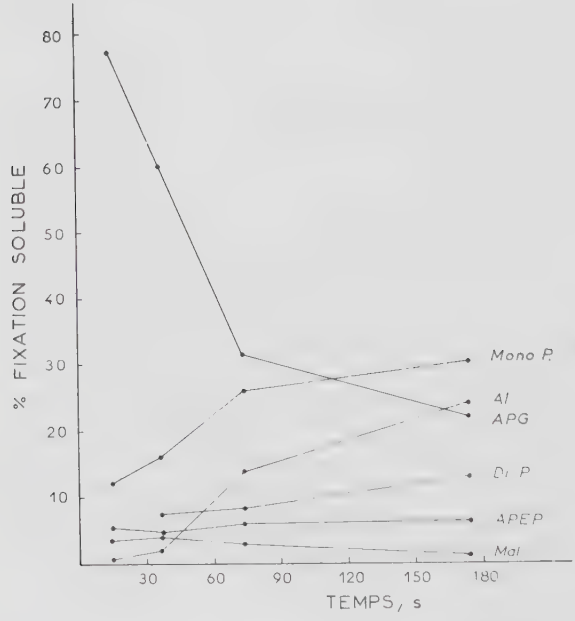


FIG. 10. — Cinétique initiale de la fixation de $^{14}CO_2$ en photoréduction chez *Scenedesmus*. Eclairement en lumière blanche, 32 000 lx. Temp. 21-23 °C. Phase gazeuse, H_2. Solution saturée en CMU.

Al. : alanine ; *APEP* : acide 2-phosphoénolpyruvique ; *APG* : acide 3-phosphoglycérique ; *Di P* : pentoses et hexoses diphosphorylés *Mal.* : malate ; *Mono P* : pentoses et hexoses diphosphorylés.

Ce phénomène est probablement lié à la forme sigmoïde de la courbe d'intensité de la photoréduction dont il sera parlé plus loin. En tout cas, on peut l'expliquer en supposant qu'à faible intensité lumineuse la concentration d'ATP disponible est trop petite pour permettre un déroulement rapide du cycle de CALVIN. Dans ces conditions, la *proportion* de ^{14}C est élevée dans l'acide malique pouvant provenir d'une carboxylation réductrice de l'acide phosphoénol pyruvique. Lorsque l'intensité lumineuse dépasse une certaine valeur, la concentration d'ATP devient suffisante pour la régénération du ribulose 1,5-diphosphate, et la proportion de ^{14}C augmente dans l'acide phosphoglycérique et ses dérivés immédiats et diminue dans l'acide malique et dans l'acide aspartique. L'apparition rapide du ^{14}C dans l'alanine en photoréduction peut s'expliquer par une amination ou une transamination réductrices de l'acide pyruvique.

Réaction oxhydrogène. La cinétique de fixation du $^{14}CO_2$ a été étudiée aussi pour la réaction oxhydrogène à l'obscurité et en présence d'un mélange gazeux contenant : H_2 92,5 %, N_2 6,0 %, O_2 1,5 % et CO_2 1,0 %. Le premier produit stable de la réaction de carboxylation est l'acide 3-phosphoglycérique et la cinétique de marquage des autres substances est comparable à celles des figures 8, 9 et 10 (GINGRAS et *al.*, 1963*a*).

Hydrogénase et absorption du CO_2. La vitesse d'absorption du gaz carbonique durant la réaction oxhydrogène est sous la dépendance de deux facteurs opposés :

a) la réaction de combinaison de l'oxygène avec l'hydrogène dont la vitesse est en rapport direct avec la tension d'oxygène.

b) l'inactivation de l'hydrogène par l'oxygène (GAFFRON, 1940).

Pour voir de quelle manière agissent ces deux facteurs, on a mesuré simultanément la vitesse d'absorption de $^{14}CO_2$ et l'activité hydrogénasique d'une même préparation de *Scenedesmus*. L'activité de l'hydrogénase a été déterminée à l'aide d'une réaction d'échange isotopique qu'elle catalyse :

$$H_2O + {}^3H_2 \rightleftharpoons {}^3H-H + {}^3H-O-H \ .$$

On trouve (GINGRAS et *al.*, 1963*a*) que l'hydrogénase est inhibée à 50 % par une tension partielle d'oxygène d'environ $6 \cdot 10^{-3}$; la vitesse de fixation de $^{14}CO_2$ est maximum entre une tension partielle d'O_2 comprise entre 0 et $5 \cdot 10^{-3}$.

5. DISCUSSION

La voie de la réduction du gaz carbonique est la même, du moins en ce qui concerne les premières étapes, pour la photosynthèse, la photoréduction et la réaction oxhydrogène. Nous avons vu que cette voie peut être décrite par le cycle de CALVIN.

Le fonctionnement de ce cycle nécessite, on le sait, la présence de $NADPH_2$ et d'ATP à raison de trois molécules d'ATP et de deux molécules de $NADPH_2$ par molécule de CO_2 réduite (CALVIN, 1956). Les trois processus cités doivent donc produire ces deux substances ; essayons de déduire par quel mécanisme.

La réaction oxhydrogène ne fait pas intervenir la photochimie et paraît donc le problème le plus facilement abordable. Sa stoechiométrie, déterminée par GAFFRON (1942*b*) est la suivante :

a) $4H_2 + 2O_2 \longrightarrow 4H_2O$

b) $2H_2 + CO_2 \longrightarrow (CH_2O) + H_2O$

La première réaction (*a*) peut avoir lieu pendant un certain temps sans la seconde, si le gaz carbonique est absent. Cette première réaction (*a*), ou réaction oxhydrogène proprement dite est fortement exergonique ($\Delta F^o = -227$ kcal) alors que la seconde (*b*) est légèrement endergonique ($\Delta F^o \simeq 2$ kcal). Si on suppose que la réaction (*a*) est couplée à une phosphorylation oxydative avec un rapport P/O = 3, par analogie avec celle qui accompagne l'oxydation de $NADH_2$ dans les mitochondries, elle pourrait fournir 12 molécules d'ATP par molécule de CO_2 réduite. L'excès d'ATP pourrait être utilisé pour les autres processus métaboliques tels que la synthèse de polysaccharides, de lipides ou de protéines. L'équation (*b*) incluerait une réduction probablement indirecte du NADP par l'hydrogène. Cette réaction est exergonique et a été démontrée avec des chloroplastes isolés en présence de ferredoxine et d'hydrogénase exogène (Tagawa et Arnon, 1962).

On vient de voir que la réduction par l'hydrogène des nucléotides à nicotinamide peut se faire sans intervention de la photochimie. On peut donc supposer que l'énergie lumineuse est utilisée aux mêmes fins que la réaction oxhydrogène proprement dite : la phosphorylation de l'ADP en ATP. Cette hypothèse a été appliquée aussi bien à la photoréduction bactérienne (Calvin, 1956 ; Arnon, 1961 ; Stanier, 1961) qu'à la photoréduction chez les algues (Gingras et *al.*, 1960 et 1963*a*). La photophosphorylation « cyclique » (Whatley et *al.*, 1959) n'impliquant pas une réduction nette du NADP correspond bien aux caractéristiques qu'on vient de proposer. On peut penser qu'en photosynthèse aérogène, intervient principalement une photophosphorylation de type « non cyclique » (production d'ATP couplée à la réduction de NADP) ; dans ce cas le mécanisme « cyclique » fournirait l'appoint en ATP, nécessaire à la réduction de CO_2. En photoréduction, seul le mécanisme « cyclique » serait fonctionnel.

IV. PIGMENTS SENSIBILISATEURS DE LA PHOTOSYNTHÈSE ET DE LA PHOTORÉDUCTION

1. INTRODUCTION

A la suite des expériences d'Emerson et de ses collaborateurs sur la chute dans le rouge du rendement quantique du dégagement d'oxygène (« red drop ») et sur la correction de cette chute par superposition à la lumière rouge d'une lumière de « courte » longueur d'onde, il est devenu clair que la photosynthèse résulte d'au moins deux réactions photochimiques. L'hypothèse prévaut à l'heure actuelle de deux réactions photochimiques en série, séparées par un nombre indéterminé d'étapes thermiques ; l'une des réactions photochimiques est oxydante par rapport à l'autre. Cette hypothèse est étayée par un faisceau de preuves expérimentales ; je ne citerai ici que les plus marquantes pour l'évolution de ce travail. On trouvera plus de détails dans les revues générales suivantes, Emerson (1958 *a*), Hoch et Kok (1961), Clayton (1963), Smith et French (1963), de Kouchkovsky (1963).

Chez *Porphyridium*, Duysens (1960) a observé l'oxydation à la lumière d'un cytochrome de type *c*. L'oxydation est sensibilisée par de la lumière rouge, absorbée par la chlorophylle, et la réduction par de la lumière verte, absorbée par la phycoérythrine. Le DCMU, ce puissant inhibiteur de l'émission d'oxygène, loin de ralentir la réaction d'oxydation la facilite au contraire. Suivant Duysens, chacune des deux

réactions photochimiques est liée à un ensemble pigmentaire différent ; l'ensemble pigmentaire sensibilisateur de la réaction d'oxydation du cyctochrome a été appelé « *système I* » et l'ensemble sensibilisateur de la réaction de réduction du cytochrome, « *système II* ». Cette appellation dans son sens élargi est maintenant communément admise et sera utilisée dans le reste de ce travail. KOK et GOTT (1960) et KOK et HOCH (1961) ont observé une oxydation photochimique d'un pigment chlorophyllien, le P 700. De même que le cytochrome, ce pigment est oxydé par de la lumière rouge lointain ($\lambda > 685$ mμ) et réduit par de la lumière excitant préférentiellement les phycobilines. L'oxydation photochimique de P 700 est insensible au DCMU. A la même époque, LOSADA et *al.* (1961) ont repris des expériences jusque là inexpliquées de KROGMANN (1958) et les ont interprètées à l'aide d'une hypothèse émise par HILL et BENDALL (1960). Voici l'observation de KROGMANN : la photophosphorylation « oxydative » (ou « non cyclique ») chez les chloroplastes isolés est inhibée par le DCMU, mais on peut lever cette inhibition en ajoutant à la préparation du trichlorophénol indophénol réduit par un excès de glutathion. D'après LOSADA et *al.* (1961), les électrons provenant de l'hydrolyse de l'eau par une première étape photochimique (système II de DUYSENS), subissent une chute de potentiel électrochimique libérant ainsi de l'énergie emmagasinée sous forme d'ATP, puis sont élevés à un potentiel suffisant pour la réduction du NADP par une seconde réaction photochimique (système I). Le DCMU ne bloque que la première réaction photochimique, de sorte que la seconde pourra continuer à fonctionner pourvu qu'il y ait un apport exogène d'électrons à un potentiel électrochimique convenable.

Si on se rappelle que la photoréduction est insensible au DCMU et qu'elle dépend d'apport d'hydrogène, on peut difficilement éviter de penser qu'elle est sous la dépendance exclusive du système I. C'est ce qu'on a essayé de vérifier à l'aide des critères suivants :

1° absence d'un effet d'exaltation dichromatique,

2° comparaison des spectres d'action de la photosynthèse et de la photoréduction. Les organismes étudiés sont l'algue verte, *Scenedesmus*, et l'algue rouge *Porphyridium* ; la photoréduction a été mise en évidence chez cette dernière par FRENKEL et RIEGER (1951).

2. CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Chaque espèce a été mise en suspension, au cours de ces expériences, dans son milieu de culture. La vérification de l'existence ou de l'absence d'un effet d'exaltation dichromatique a été effectuée à l'aide de deux faisceaux de lumière, l'un provenant du monochromateur (F_1) et l'autre (F_2) d'une lampe de microscope de 60 W (NACHET) rendu monochromatique par un filtre interférentiel (MTO, $\Delta\lambda$ à T 0,5 = 12 mμ) centré à 564 mμ. La composition des mélanges gazeux (obtenus de la firme « AIR LIQUIDE ») était la suivante : pour les études de photosynthèse, 750 vpM de CO_2 dans l'air ; pour la photoréduction 750 vpM de CO_2 dans l'hydrogène. L'« adaptation » à l'hydrogène a consisté en un séjour de 12 h sous atmosphère d'hydrogène et à l'obscurité, avec une circulation continue de milieu de culture.

Les spectres d'absorption de *Porphyridium* ont été mesurés au spectrophotomètre enregistreur CARY, modèle 14. Pour corriger l'effet de dispersion de la lumière, on s'est servi du dispositif prévu à cette fin par CARY, complété par des lames de verre opalin selon la technique de SHIBATA et *al.* (1954). Les algues furent suspendues dans leur milieu de culture où elles ne sédimentent que très lentement.

3. LA PHOTORÉDUCTION EN FONCTION DE L'INTENSITÉ LUMINEUSE

La courbe d'intensité de la photoréduction est sigmoïde aussi bien chez *Scenedesmus* (Rieke, 1949) que chez les bactéries photosynthétiques (French, 1937). Ayant accidentellement observé ce phénomène, au cours de l'étude du spectre d'action, on en a cherché une explication. S'il est vrai que le rôle principal de la photochimie au cours de la photoréduction est la synthèse d'ATP, c'est là qu'il faut chercher cette explication. L'effet serait donc attribuable à une concentration cellulaire d'ATP quasi nulle aux faibles intensités lumineuses. Pour vérifier cette hypothèse on a agi comme suit sur la concentration stationnaire d'ATP.

Gaffron (1940) avait montré que le glucose inhibe aussi bien l'absorption de l'hydrogène que celle du gaz carbonique chez *Scenedesmus*. Les expériences de Bishop (1961) ont plus tard révélé que cette inhibition est due en réalité à une compétition pour l'ATP entre les réactions d'assimilation du gaz carbonique et du glucose. En effet, en anaérobiose et en présence de DCMU, le glucose est transformé quantitativement en amidon à la lumière. De plus, l'inhibition par le glucose ne dure qu'aussi longtemps que ce sucre n'a pas été consommé par les cellules ; une fois le glucose disparu du milieu, la photoréduction reprend son cours.

La courbe de la vitesse d'absorption de CO_2 en fonction de l'intensité lumineuse (ou plus brièvement « courbe d'intensité ») obtenue dans les conditions définies par la légende de la figure 11, présente un caractère sigmoïde beaucoup plus accusé en présence de glucose. Il est à remarquer en outre que les deux courbes sont paral-

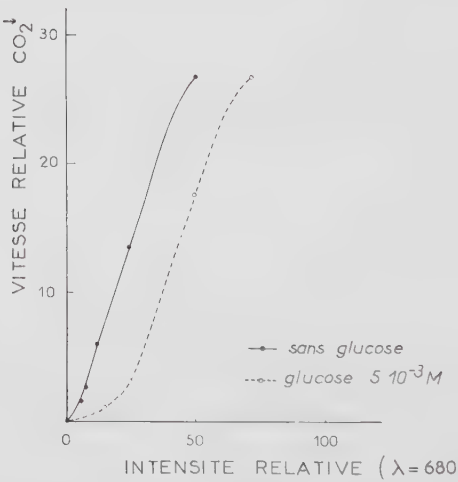


Fig. 11. — Vitesse de l'absorption de CO_2 en fonction de l'intensité lumineuse par *Scenedesmus* en photoréduction : effet du glucose. Intensité incidente 100 = $1{,}6 \cdot 10^3$ ergs $\cdot cm^{-2} \cdot s^{-1}$. Temp. 25 °C. Phase gazeuse, H_2-CO_2(10^6 - 750) CMU, $5 \cdot 10^{-5}$ M.

lèles dans leur partie linéaire ; la légère incurvation vers les grandes intensités représente une limitation de la vitesse de la photoréduction par la tension de gaz carbonique. Voici comment on peut expliquer l'intensification par le glucose de la forme sigmoïde de la courbe.

L'affinité pour l'ATP des enzymes de polymérisation du glucose est supérieure à celle des enzymes du cycle de la réduction du gaz carbonique. Ce qui signifie que pour les concentrations stationnaires limitantes d'ATP, l'assimilation du glucose prévaudra sur celle du gaz carbonique. A mesure qu'augmente l'intensité lumineuse, la vitesse de régénération de l'ATP augmente aussi et par conséquent surtout la vitesse d'absorption du glucose. Il doit arriver un point où la courbe de la vitesse d'assimilation du glucose en fonction de l'intensité lumineuse atteint un plateau, la limitation pouvant être due à la concentration de glucose dans le milieu. Si l'intensité lumineuse continue à augmenter au-dessus de ce point, tout l'ATP produit par chaque quantum supplémentaire ne sert plus qu'à la réduction du gaz carbonique. De sorte qu'à faible intensité lumineuse la vitesse de réduction du gaz carbonique peut être nulle ou presque, mais une fois atteinte l'intensité de saturation de l'assimilation du glucose, le rendement quantique (proportionnel à la pente de la courbe d'intensité) de la réduction du gaz carbonique deviendra constant et égal à celui obtenu sans glucose.

L'effet du glucose et l'explication qu'on peut en fournir, sans démontrer l'origine de la forme sigmoïde de la courbe d'intensité, rendent cependant plausible l'intervention de la concentration de l'ATP. On va retrouver cette intervention dans les deux hypothèses suivantes : selon la première de ces hypothèses, une réaction de phosphorylation à forte affinité pour l'ATP serait en compétition avec les réactions du cycle du carbone ; cette réaction compétitive pourrait être une synthèse d'amidon ou de lipides par exemple. Suivant la seconde hypothèse, la courbe d'intensité de la photophosphorylation serait elle-même sigmoïde. Cette supposition est confirmée par les résultats de plusieurs auteurs, soit pour la photophosphorylation « non cyclique » avec des accepteurs d'électrons comme le 2,3,6-trichlorophénol indophénol (Krogmann, 1960), le NADP (Turner et *al.*, 1962) ou le ferricyanure (Shen et Shen, 1962), soit pour la photophosphorylation « cyclique » avec le PMS (Shen et Shen, 1962). Cet effet est spécifique de la formation d'ATP, puisque les courbes d'intensité de réduction du NADP (Turner et *al.*, 1962) ou du ferricyanure (Shen et Shen, 1962) établies en même temps et pour la même préparation sont, elles, linéaires. D'après l'élégant travail de Shen et Shen (1962), cet effet est causé par une réaction thermique de destruction d'un intermédiaire formé à la lumière, *Z*, qui réagit avec l'ADP et le phosphate inorganique. Il s'agirait d'une réaction rapidement saturée et catalysée par une enzyme ayant une forte affinité pour *Z* et non pas d'une ATPase.

Puisque la courbe d'intensité de la photophosphorylation est sigmoïde, la courbe d'absorption du gaz carbonique pourrait être sigmoïde même en photosynthèse. Chez *Scenedesmus* le phénomène est moins net pour la photosynthèse que pour la photoréduction, mais il apparait clairement chez les chloroplastes isolés (Turner et *al.*, 1962).

Il est difficile de faire un choix entre les deux hypothèses qu'on vient de proposer et qui d'ailleurs ne sont pas mutuellement exclusives. La seconde a cependant l'avantage d'une plus grande simplicité. Quelle que soit l'explication retenue, on suppose une concentration stationnaire d'ATP presque nulle aux faibles intensités lumineuses. Cette interprétation permet en outre de comprendre la prédominance de la fixation du $^{14}CO_2$ dans l'acide malique décrite plus haut, aux faibles éclairements.

4. L'EFFET D'EXALTATION DICHROMATIQUE CHEZ *PORPHYRIDIUM* EN PHOTOSYNTHÈSE; SON ABSENCE EN PHOTORÉDUCTION

La chute dans le rouge du rendement quantique du dégagement d'oxygène est due à une limitation de vitesse imposée par le système II dont l'absorption est faible aux grandes longueurs d'onde. Cette chute de rendement peut être corrigée par une excitation simultanée, à une autre longueur d'onde, utilisée par la photoréaction I dont la vitesse peut alors cesser d'être limitante (EMERSON et *al.*, 1957). La chute dans le rouge est beaucoup plus brutale chez *Porphyridium* que chez les algues vertes (HAXO et BLINKS, 1950). Cela, joint au fait que le maximum d'efficacité pour l'excitation du système II se situe dans le vert, à une longueur d'onde où la chlorophylle absorbe peu, fait de *Porphyridium* un matériel de choix pour l'observation de l'exaltation dichromatique.

Pour vérifier l'absence de ce phénomène en photoréduction, on a réuni les conditions les plus favorables à son observation ; en plus de l'espèce étudiée, ce sont :

1° une forte excitation du système II par rapport au système I,

2° une linéarité de la réponse en fonction de l'intensité lumineuse. MYERS et GRAHAM (1963) ont observé un maximum d'exaltation dichromatique chez *Chlorella*, pour un rapport du dégagement d'oxygène produit à 650 mμ sur celui produit à 700 mμ, compris entre 5 et 10. Dans ce travail, les intensités ont été réglées de manière à ce que 10 fois plus d'oxygène soit dégagé en présence du faisceau F_2 (λ = 564 mμ) qu'en présence du faisceau F_1 pour λ = 690 mμ en photosynthèse. L'exaltation est calculée ici comme le rapport de la vitesse stationnaire d'un échange gazeux produit par le faisceau (F_1) en présence du fond de 564 mμ (F_2) sur la vitesse observée avec le faisceau (F_1) seul.

On peut l'exprimer ainsi :

$$\text{Exaltation} = \frac{F_1(F_2)}{F_{1\,seul}} .$$

On a d'abord vérifié la présence de l'effet pour les échanges gazeux photosynthétiques (fig. 12). Les vitesses, en présence de la lumière monochromatique de 560 mμ ou de 690 mμ, sont mesurées seules d'abord, puis en présence d'un fond monochromatique de 564 mμ. Les vitesses produites par la lumière de 690 mμ sont exaltées en présence du fond de 564 mμ. Au contraire, les vitesses observées à 560 mμ sont légèrement réduites en présence du fond de 564 mμ à cause d'une limitation imposée par la tension de gaz carbonique. Le tableau I donne les valeurs numériques de l'exaltation. Ces valeurs sont semblables pour les deux gaz mesurés. Si on corrige la valeur de l'exaltation à 690 mμ de la valeur d'inhibition apparente à 560 mμ, on obtient des exaltations supérieures à 3.

La même préparation, adaptée à l'hydrogène, a ensuite subi le même test. Les résultats de ce test sont résumés par la figure 13 et le tableau I. On observe à 690 mμ une absorption de gaz carbonique sans dégagement d'oxygène. Le fond lumineux vert (F_2 : 564 mμ ; intensité relative = 1) donne aussi une absorption de gaz carbonique mais provoque, lui, un léger dégagement d'oxygène. Le faisceau rouge qu'on y superpose (F_1 : 690 mμ, F_2 : 564 mμ) modifie à peine la vitesse de dégagement d'oxygène. Par contre l'augmentation de la vitesse d'absorption du gaz carbonique qu'il cause est identique à la vitesse obtenue avec le faisceau rouge

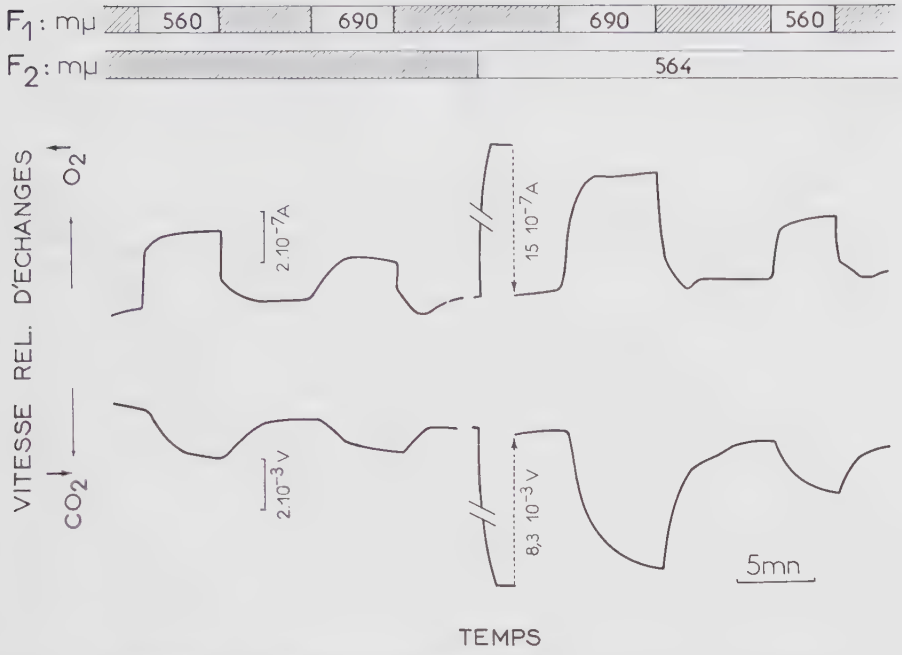


FIG. 12. — Exaltation dichromatique des échanges d'O_2 et de CO_2 en photosynthèse chez *Porphyridium*. Les échanges causés par la lumière rouge ($\lambda = 690$ mμ) sont augmentés environ trois fois par la présence d'un fond lumineux vert ($\lambda = 564$ mμ). F_1 faisceau lumineux de $\lambda = 560$ mμ ou 690 mμ ; F_2 faisceau lumineux de $\lambda = 564$ mμ. Temp., 25 °C. Phase gazeuse, air - CO_2 (10^6 - 750). Les échanges de gaz sont exprimés en ampères pour O_2 et en volts pour CO_2.

TABLEAU I

Comparaison des vitesses de l'émission d'O_2 et de l'absorption de CO_2 en photosynthèse et en photoréduction, en présence de différentes longueurs d'onde

Porphyridium. *Temp.* 25 °C

	Conditions d'éclairement		Vitesse relative $O_2\uparrow$		Vitesse relative $CO_2\downarrow$	
	F_1 : λ	F_2 (564 mμ) : Int. relative	F_1	$\frac{F_1(F_2)}{F_{1\,seul}}$	F_1	$\frac{F_1(F_2)}{F_{1\,seul}}$
Photosynthèse	560 mμ	0	28	—	6,5	—
	690 mμ	0	15	—	3,8	—
	560 mμ	2,5	24	0,86	4,8	0,75
	690 mμ	2,5	43	2,87	11,1	2,9
Photoréduction	690 mμ	0	0	—	4,6	—
	690 mμ	1	3	$\gg 1$	4,7	1,0
	690 mμ	2,5	16	$\gg 1$	6,0	1,3

seul (F_1 : 690 mμ). Si on augmente l'intensité du fond vert (F_2 : 564 mμ ; intensité relative : 2,5), on observe un fort dégagement d'oxygène concomittant à l'absorption de gaz carbonique. Et cette fois, le faisceau rouge qu'on y superpose (F_1 : 690 mμ,

F_2 : 564 mμ) produit à la fois un dégagement d'oxygène et une absorption de gaz carbonique. Seulement dans ce dernier cas, obtient-on une légère exaltation dichromatique de l'absorption du gaz carbonique (tableau I) ; cette exaltation est d'ailleurs explicable par un retour partiel à la photosynthèse dont témoigne le dégagement d'oxygène.

Donc dans les conditions où une exaltation dichromatique très nette est observable en photosynthèse, on ne la constate pas chez *Porphyridium* en photoréduction. Bishop et Gaffron (1963) sont arrivés à la même conclusion pour *Scenedesmus*. Le cas de *Porphyridium* est particulièrement démonstratif puisqu'on y observe une exaltation corrigée de 3,8 pour l'absorption du gaz carbonique en photosynthèse et aucune en photoréduction. Il n'y a donc aucune raison de penser que la photo-

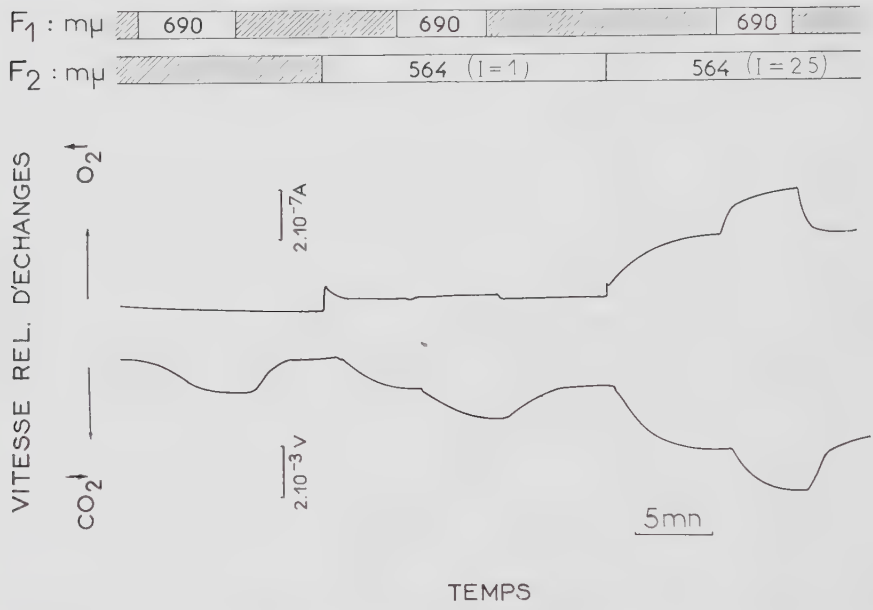


Fig. 13. — Absence d'exaltation dichromatique pour les échanges d'O_2 et de CO_2 en photoréduction chez *Porphyridium*.

F_1 = faisceau lumineux de $\lambda = 690$ mμ ;
F_2 = faisceau lumineux de $\lambda = 564$ mμ.

Temp. 25 °C. Phase gazeuse, H_2 - CO_2 (10^6 - 750). Même préparation d'algues que pour la figure 12. Les échanges de gaz sont exprimés en ampères pour O_2 et en volts pour CO_2.

réduction fasse intervenir plus d'une réaction photochimique. L'absence d'exaltation dichromatique chez *Rhodospirillum rubrum* pour l'absorption anaérobique de gaz carbonique en présence d'acétate (Blinks et Van Niel, 1963) conduit à la même interprétation.

Il convient cependant de noter que l'absence d'exaltation dichromatique ne démontre pas par elle-même la participation d'une seule réaction photochimique. Dans le cas présent, cette absence montre que la vitesse de la photoréaction II n'est pas limitante pour la photoréduction. Toutefois, l'absence d'exaltation dichromatique et l'insensibilité au CMU — inhibiteur spécifique de la photoréaction II,

comme on le verra plus loin — s'interprètent le plus commodement par le fonctionnement de la seule photoréaction I.

La plus grande efficacité de la lumière rouge (690 mμ) pour l'absorption du gaz carbonique, et de la lumière verte (564 mμ) pour le dégagement d'oxygène (fig. 13) est due à une absorption lumineuse relativement plus grande pour le système I dans le rouge et pour le système II dans le vert.

5. SPECTRES D'ACTION DE LA PHOTOSYNTHÈSE ET DE LA PHOTORÉDUCTION

Après avoir établi que la photoréduction est sensibilisée par le système I, on a essayé d'établir la composition pigmentaire de ce système.

a) *Porphyridium cruentum*

La figure 14 donne un spectre d'action du dégagement d'oxygène chez *Porphyridium*. L'échelle a été choisie de manière à faire coïncider le spectre d'absorption avec le spectre d'action à 565 mμ. On est frappé par la faible efficacité de la lumière absorbée par la chlorophylle. La chute dans le rouge est beaucoup plus brutale ici que chez les algues vertes. On note également une faible efficacité de la lumière absorbée par les caroténoïdes. Ces observations, faites d'abord par HAXO et BLINKS (1950) chez les algues rouges, ont été depuis confirmées par plusieurs auteurs. Une asymétrie à 670 et 680 mμ, apparente dans ce spectre (fig. 14, photosynthèse) est visible aussi dans la plupart des spectres d'action obtenus dans ce travail sauf dans ceux de la photosynthèse chez les algues vertes. On remarque également un épaulement vers 700 mμ, facilement observable aussi chez *Chlorella* et *Scenedesmus* si on emploie des suspensions assez denses pour augmenter la réponse observée aux grandes longueurs d'onde. Cet épaulement correspond probablement à une forme pigmentaire ayant un maximum d'absorption à 700 mμ (FRENCH et ELLIOT, 1957 ; ALLEN et *al.*, 1960 ; BUTLER, 1961).

Le spectre d'action de l'absorption du gaz carbonique sous hydrogène (fig. 14) a été établi en présence de DCMU ($4 \cdot 10^{-5}$ M) pour éviter toute intervention de la photosynthèse. L'échelle a été calculée pour que les spectres d'action et d'absorption coïncident à 680 mμ. A la différence de la photosynthèse, les longueurs d'onde les plus efficaces sont celles qui sont absorbées par la chlorophylle. Les radiations absorbées par les caroténoïdes (épaulement à 470 mμ) et la phycoérythrine sont actives aussi. Ce spectre d'action, comme celui de la photosynthèse (fig. 14) et comme celui de l'extra-absorption d'oxygène (fig. 15), présente des accidents vers 670 et 680 mμ. Le spectre de l'extra-absorption établi d'abord par FRENCH et FORK (1963), a été calculé ici suivant la méthode de ces auteurs. L'extra-absorption consiste en une absorption transitoire d'oxygène consécutive à l'extinction de la lumière. Ce phénomène, comme la photoréduction, est insensible à des concentrations de DCMU suffisantes pour inhiber tout dégagement d'oxygène. Cette observation confirme que l'extra-absorption est bien liée au système I, comme le pensent FRENCH et FORK (1963).

La présence des accidents vers 670 et 680 mμ dans les spectres d'action n'est probablement pas un artéfact ; on la retrouvera, en tout cas, tout au long de ce travail. Ces accidents paraissent correspondre aux holochromes chlorophylliens mis en évidence *in vivo* par FRENCH et HUANG (1956).

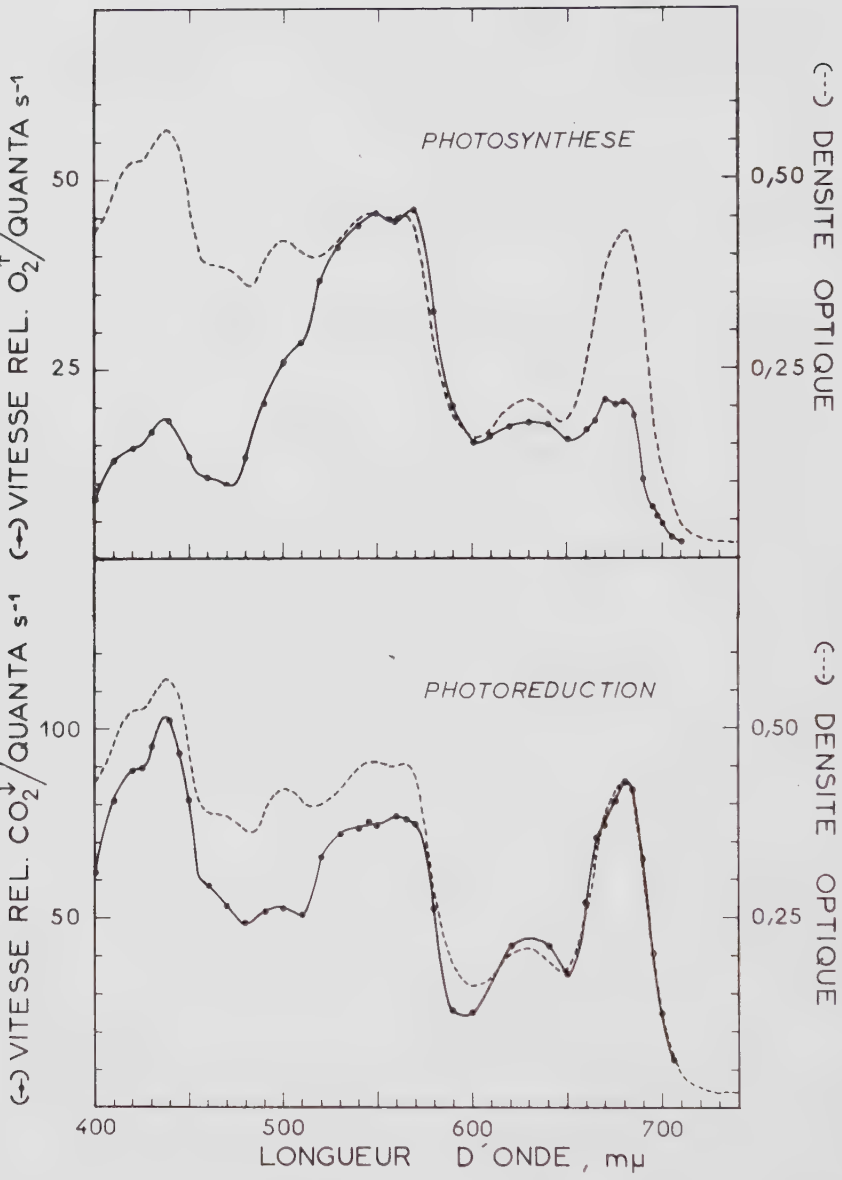


FIG. 14. — Spectres d'action (● ——●) de la photosynthèse ($O_2\uparrow$) et de la photoréduction ($CO_2\downarrow$) chez *Porphyridium*. Comparaison avec le spectre d'absorption (— — —) d'une suspension des mêmes algues. Temp. 25 °C. *Photosynthèse* : phase gazeuse, air - CO_2 (98 - 2) ; $\Delta\lambda$ à la demi-transmission = 9 mμ de 400 à 500 mμ et = 4,5 mμ de 500 à 700 mμ. *Photoréduction* : phase gazeuse, H_2 - CO_2 (10^6 - 750) ; $\Delta\lambda$ à la demi-transmission = 7,5 mμ de 400 à 500 mμ et = 4,0 mμ de 500 à 700 mμ ; DCMU, $4 \cdot 10^{-5}$ M.

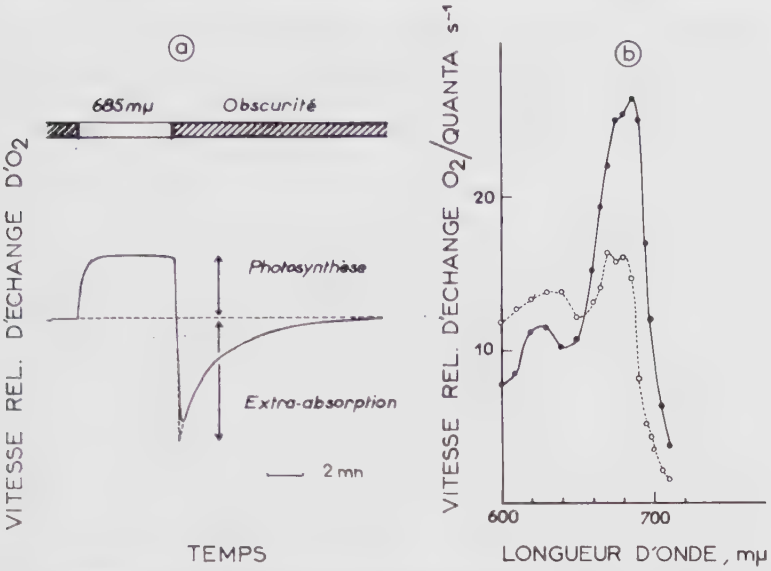


FIG. 15. — *a*) Cinétique de l'émission photosynthétique et de l'extra-absorption d'O_2 chez *Porphyridium* et méthode de mesure.

b) Spectres d'action du dégagement (o— — —o) et de l'extra-absorption (●———●) d'O_2. Temp. 25 °C. $\Delta\lambda$ à la demi-transmission = 4,5 mμ. Phase gazeuse, air - CO_2 (98 - 2).

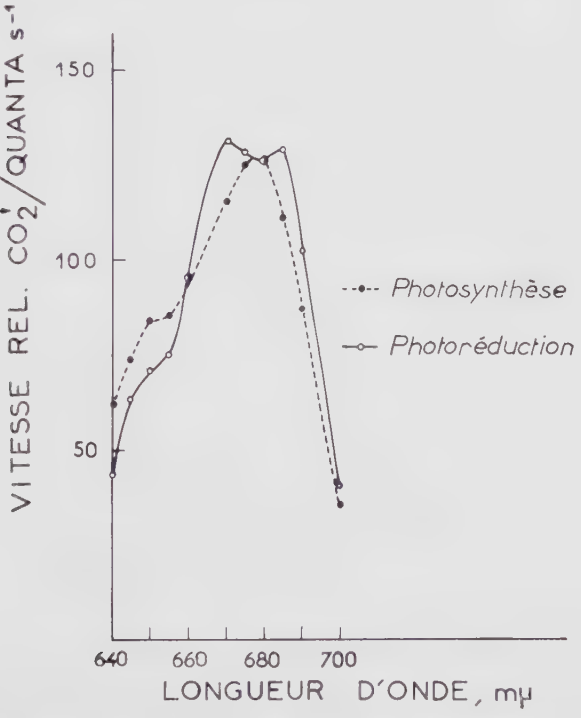


FIG. 16. — Spectres d'action de l'absorption de CO_2 en photosynthèse et en photoréduction chez *Scenedesmus*. Temp. 25 °C. $\Delta\lambda$ à la demi-transmission = 6 mμ. Photosynthèse : air - CO_2 (10^6 - 800). Photoréduction : H_2 - CO_2 (10^6 - 800) ; CMU, 10^{-4} M.

b) *Scenedesmus obliquus*

On a vu plus haut que BISHOP et GAFFRON (1963) ont montré l'absence d'exaltation dichromatique chez *Scenedesmus* en présence d'hydrogène. Les spectres d'action de l'absorption du gaz carbonique en photosynthèse et en photoréduction, faits avec la même culture de cette algue, sont représentés sur la figure 16. Aux fins de comparaison, on a fait coïncider ces deux spectres à 675 mμ, maximum d'action de la photosynthèse. Les mesures de la photoréduction ont été faites en présence de CMU (10^{-4} M). Le spectre de la photoréduction fait apparaître les accidents à 670 et 680 mμ signalés plus haut chez *Porphyridium*. La participation de la chlorophylle *b* (épaulement à 650 mμ) est évidente dans les deux spectres. Ces accidents (650, 670 et 680 mμ) ne sont pas toujours aussi nets en photoréduction et varient d'importance suivant les préparations. Pour certaines préparations, seul l'épaulement à 650 mμ est visible, le sommet étant alors arrondi entre 670 et 685 mμ. Ces différences tiennent sans doute aux variations de la composition pigmentaire des diverses cultures et aussi au recouvrement partiel des différentes bandes d'absorption qui rend difficile leur mise en évidence.

La détermination du spectre d'action de la photoréduction s'est avérée beaucoup plus malaisée chez *Scenedesmus* que chez *Porphyridium* ; la perte d'activité au cours du temps est considérable chez *Scenedesmus*. Cette différence paraît correspondre à la possibilité de cultiver *Porphyridium* (FRENKEL et RIEGER, 1951), mais non *Scenedesmus*, en photoréduction.

6. DISCUSSION

L'absence d'exaltation dichromatique, l'insensibilité au CMU et le spectre d'action de la photoréduction montrent que ce phénomène est sous la dépendance exclusive de la photoréaction I. Il est frappant néanmoins que des pigments, qu'on suppose généralement prépondérants dans le système II, sensibilisent aussi très efficacement la photoréduction ; c'est le cas de la chlorophylle *b* et de l'holochrome $Chla_{670}$ chez les algues vertes (MYERS et FRENCH, 1960 et le présent travail ch. V et VI) et de la phycoérythrine chez les algues rouges (EMERSON, 1958 *b*). La participation des phycobilines au système I a été démontrée également par le spectre d'action de l'oxydation du cytochrome C 420 en présence de DCMU chez *Porphyridium* (DUYSENS et AMESZ, 1962) et chez *Anacystis* (AMESZ et DUYSENS, 1962).

Notons toutefois que les spectres d'action de l'extra-absorption d'oxygène chez *Porphyridium* (FRENCH et FORK, 1963) ne font pas apparaître d'activité de la phycoérythrine.

Cependant, si les mêmes pigments sensibilisent les deux réactions photochimiques, la lumière qu'ils absorbent n'est pas utilisée avec la même efficacité par ces deux réactions. Si on conçoit les deux systèmes comme topographiquement distincts et de composition pigmentaire différente, l'efficacité de la lumière absorbée par un pigment donné pour l'une ou l'autre des photoréactions sera déterminée par :

1° la concentration de ce pigment dans le système étudié par rapport à sa concentration totale,

2° l'efficacité des transferts d'énergie vers le centre photochimique,

3° l'efficacité de chaque quantum parvenant au centre photochimique.

Le rendement optimum pour la réduction de NADP, en présence de dichlorophénol-indophénol réduit et de DCMU, est de 1 équivalent par quantum absorbé

(HOCH et MARTIN, 1963). Le rendement quantique de la photoréaction II est encore inconnu. De toute manière les données qu'on vient de présenter ne permettent pas de départager l'influence des deux premiers facteurs. On peut cependant comparer semi-quantitativement les deux systèmes quant à l'efficacité relative de l'excitation des divers pigments à l'intérieur d'un même système.

Si le spectre d'action de la photoréduction révèle la composition pigmentaire du système I, celui du dégagement d'oxygène est compliqué par la participation des deux réactions photochimiques. La superposition des deux spectres d'action ne peut donc servir de base à une comparaison quantitative. On a comparé chez *Porphyridium* (fig. 14) les spectres d'action avec les spectres d'absorption exprimés en densité optique. Si on ne tient pas compte des effets secondaires (diffusion lumineuse, effet crible, etc.) qui font dévier de la loi de Beer-Lambert, les spectres d'absorption de suspension, cette comparaison se justifie de la manière suivante. La vitesse du phénomène photochimique à une longueur d'onde donnée est proportionnelle au nombre de quanta absorbés par unité de temps. Posons :

k : constante,

V_p : vitesse de la réaction photochimique,

I_0 : intensité lumineuse incidente,

I : intensité lumineuse transmise,

α : coefficient d'extinction,

d : épaisseur en centimètres.

La relation qu'on vient d'énoncer peut s'écrire :

$$Vp = kI_0 \frac{I_0 - I}{I_0}$$

or : $$\frac{I}{I_0} = e^{-\alpha d} \text{ (Loi de Lambert)}$$

d'où : $$\frac{I_0 - I}{I_0} = 1 - e^{-\alpha d}$$

Lorsqu'on a affaire à une couche très mince formée de un ou deux lits cellulaires, comme c'est le cas pour les spectres d'action présentés ici, le terme αd est très petit et la valeur de $(I_0 - I)/I_0$ s'approche de αd (DUYSENS, 1952, p. 16). Dans ces conditions :

$$V_p = k\, I_0\, \alpha d.$$

Et puisque le spectre d'action et le spectre d'absorption sont déterminés sur des préparations d'épaisseur différente, mais constante pour un même spectre, ils sont tous deux proportionnels à α.

Appliquons d'abord cette méthode au calcul des efficacités relatives de la lumiére

absorbée par la phycoérythrine et la phycocyanine en photosynthèse chez *Porphyridium*. FRENCH et YOUNG (1952) et DUYSENS (1952) ont montré que l'efficacité des transferts d'énergie de la phycoérythrine vers la phycocyanine est comprise entre 80 % et 100 %, ce qui implique que l'efficacité quantique est plus grande pour les longueurs d'ondes absorbées par la phycocyanine. Faisons les hypothèses suivantes :

1° le rapport des coefficients d'extinction $\frac{\alpha\ 663\ m\mu}{\alpha\ 620\ m\mu}$ pour la chlorophylle *a* dans le méthanol et le rapport $\frac{\alpha\ 680\ m\mu}{\alpha\ 630\ m\mu}$ pour la chlorophylle *a in vivo* sont les mêmes. Ce rapport est de 0,235 d'après les données de HARRIS et ZSCHEILE (1943).

2° la lumière absorbée par la chlorophylle à 680 et à 630 mμ a une efficacité identique.

3° la lumière absorbée par la phycoérythrine à 560 mμ a une efficacité relative de 100 %.

On calcule ainsi l'action et l'absorption partielles dues à la chlorophylle à 630 mμ. La différence est causée par la phycocyanine. On trouve alors un rapport action/absorption de 115 % pour la phycocyanine.

La troisième hypothèse est donc fausse : l'excitation de la phycoérythrine a une efficacité photosynthétique de 87 % par rapport à celle de la phycocyanine. Ce résultat est en accord avec l'hypothèse d'un transfert d'énergie de la phycoérythrine vers la phycocyanine, en photosynthèse.

Le même raisonnement qui suppose une efficacité de 100 % pour la lumière absorbée par la phycocyanine donne une efficacité relative apparente de 42 % pour l'énergie absorbée par la chlorophylle à 680 mμ. Ces valeurs sont comparables à celles obtenues par DUYSENS (1952).

Ces estimations peuvent être faussées par l'inexactitude partielle des deux premières hypothèses, et en particulier, par l'existence de deux systèmes pigmentaires. Cette analyse appliquée à la photoréduction ne présente pas cet inconvénient ; elle peut servir au calcul des efficacités relatives de transfert d'énergie à l'intérieur d'un même système pigmentaire. On supposera donc :

1° que l'énergie absorbée par les divers pigments est transmise aux centres photochimiques par l'intermédiaire de la chlorophylle et,

2° que l'efficacité des transferts de la chlorophylle vers les centres photochimiques est voisine de 100 %. Ces hypothèses sont étayées par les travaux de DUYSENS (1952).

Si l'on attribue une valeur de 100 % à l'efficacité de la lumière absorbée à 680 mμ en photoréduction, la comparaison des spectres d'action et d'absorption conduit aux valeurs relatives suivantes : à 630 mμ, 103 % $\simeq$ 100 %, à 550 mμ, 83 %.

L'absorption par la chlorophylle et par la phycocyanine peut être considérée comme négligeable à 550 mμ (environ 2 % du total pour chacun de ces pigments d'après DUYSENS, 1952). On peut donc affirmer que l'efficacité relative des transferts d'énergie est de 100 % pour la phycocyanine et de 85 % environ pour la phycoérythrine.

Le calcul analogue pour les caroténoïdes est beaucoup plus difficile à faire chez *Porphyridium* (voir à ce sujet BRODY et EMERSON, 1959) ; dans la région des courtes longueurs d'onde plusieurs pigments absorbent, en effet, dans des rapports peu faciles à déterminer. Cependant les rapports des activités (par quantum incident) à 470/440 mμ et 470/420 mμ sont identiques pour la photosynthèse et pour la photoréduction, soit de 0,52 et 0,66. Ces valeurs peuvent indiquer que le rapport des efficacités relatives de transfert d'énergie caroténoïdes/chlorophylle est le même pour les deux systèmes pigmentaires. La plus faible efficacité de la lumière absorbée dans le bleu relativement à la lumière absorbée dans le rouge peut s'expliquer par un effet d'écran exercé dans le bleu par les caroténoïdes. L'efficacité de transfert d'énergie de ces derniers est d'environ 50 % relativement à celle de la chlorophylle, d'après les spectres d'excitation de la fluorescence de la chlorophylle (DUYSENS, 1952).

La superposition, parfaite aux erreurs expérimentales près, des spectres d'absorption et d'action de 705 à 610 mμ chez *Porphyridium* pour la photoréduction ne paraît pas compatible avec l'existence d'une fraction pigmentaire composée surtout des holochromes C 673 et C 683 transférant l'énergie absorbée *uniquement* vers la photoréaction II. On est donc amené à supposer que la probabilité de transfert de ces holochromes vers les centres photochimiques I est loin d'être nulle. En tous cas lorsque le substrat de la photoréaction II est réduit, comme c'est le cas en présence d'hydrogène (ch. VI), l'efficacité de transfert vers la photoréaction I serait voisine pour les holochromes C 673 et C 683 et pour les holochromes ayant des bandes d'absorption dans le rouge lointain. Si l'on étend ce raisonnement aux phycobilines, il semble logique d'admettre que toute la phycoérythrine et toute la phycocyanine peuvent transférer l'énergie lumineuse vers la photoréaction I avec une efficacité voisine de 85 % pour la première et de 100 % pour la seconde.

La même hypothèse est applicable à la photoréduction chez *Scenedesmus*. On a vu (fig. 16) que le spectre d'action de la photoréduction fait apparaître des accidents correspondant à la chlorophylle *b* et aux holochromes C 673 et C 683. Cette observation s'expliquerait par un transfert d'énergie des pigments du système II vers la photoréaction I en présence d'hydrogène.

Le schéma de migration de l'énergie lumineuse à travers les pigments proposé par DUYSENS (1952) semble pouvoir s'appliquer avec quelques modifications aux deux systèmes photochimiques. Ce problème sera repris à la fin de ce travail (voir discussion générale ch. VII et fig. 29).

V. MODE D'INHIBITION DU DÉGAGEMENT D'O_2 PAR LA 3-(4-CHLOROPHÉNYL)-1,1-DIMÉTHYLURÉE

1. INTRODUCTION

La photoréduction est insensible à plusieurs agents d'inhibition du dégagement photosynthétique d'oxygène et notamment à l'hydroxylamine (GAFFRON, 1942 *a*), à l'orthophénanthroline et à la carence en manganèse (KESSLER, 1957). Les dérivés substitués de la phényl-diméthylurée, dont le CMU et le DCMU, sont parmi les

inhibiteurs les plus spécifiques et les plus efficaces du dégagement d'oxygène qui accompagne la photosynthèse et la réaction de Hill (Wessels et Van der Veen, 1956 ; Spikes, 1956). Bishop (1958) a montré que le DCMU, loin d'inhiber la photoréduction, la favorise au contraire en empêchant le retour à la photosynthèse aérogène (« désadaptation ») qui se produit aux fortes intensités lumineuses. C'est à cet usage que le CMU et le DCMU ont été employés dans les expériences décrites plus haut. Il a paru intéressant d'essayer de préciser le mode et le site d'action de ces inhibiteurs et d'éclairer ainsi les mécanismes de la photoréduction et du dégagement d'oxygène.

2. CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

L'organisme étudié, *Chlorella pyrenoidosa*, a été cultivé comme il est décrit plus haut. La suspension d'algues baigne, à travers la membrane à dialyse, dans un milieu composé de 720 ml de tampon phosphate de potassium 75 mM (pH 6,4), de 230 ml de milieu de culture et de 50 ml de KCl 2 M ; le pH final de ce milieu est de 6,3. La température du milieu est constante à $\pm 0{,}05$ °C. A moins de mention contraire, le mélange gazeux obtenu à l'aide de débitmètres est de 97 parties d'air pour 3 de gaz carbonique.

Pour les expériences avec des éclairs, on a utilisé une lampe à décharge MAZDA TE 100, sous 900 V de tension. D'après le calcul, l'énergie dissipée est de 13 joules. L'éclair, analysé à l'aide d'un photomultiplicateur et d'un oscilloscope, atteint son intensité maximum en $2 \cdot 10^{-4}$ s et émet 66 % de sa lumière en 10^{-3} s.

La lumière de fond utilisée dans ces expériences provient d'une lampe de microscope NACHET de 30 W dont le faisceau rendu parallèle passe par des filtres interférentiels MTO. Ces filtres ont des maximums d'absorption respectifs à 651 et à 729 mμ avec une demi-bande passante de 12 mμ. Cette source a été utilisée également pour la détermination des courbes d'intensité en lumière blanche.

3. INHIBITION DU DÉGAGEMENT STATIONNAIRE D'O_2

L'inhibition en fonction de l'intensité lumineuse

La figure 17 donne les courbes d'intensité lumineuse du dégagement d'oxygène à diverses concentrations de CMU. De faibles concentrations agissent uniquement sur la partie linéaire de la courbe, mais à mesure que la concentration augmente, l'inhibition se fait aussi sentir sur le plateau. C'est ce qui apparaît plus nettement sur la figure 18 où est porté, en fonction de la concentration de CMU dans le milieu, le degré d'inhibition en lumière limitante et en lumière saturante. La demi-inhibition s'obtient à la concentration de $4 \cdot 10^{-7}$ M pour les faibles intensités et de $2 \cdot 10^{-6}$ M pour les fortes intensités. Cette différence de sensibilité suivant l'intensité lumineuse peut suggérer que l'inhibiteur agit à deux niveaux de sensibilité différente : une étape photochimique ou bien une réaction thermique limitante (Gingras et *al.*, 1963 *b*).

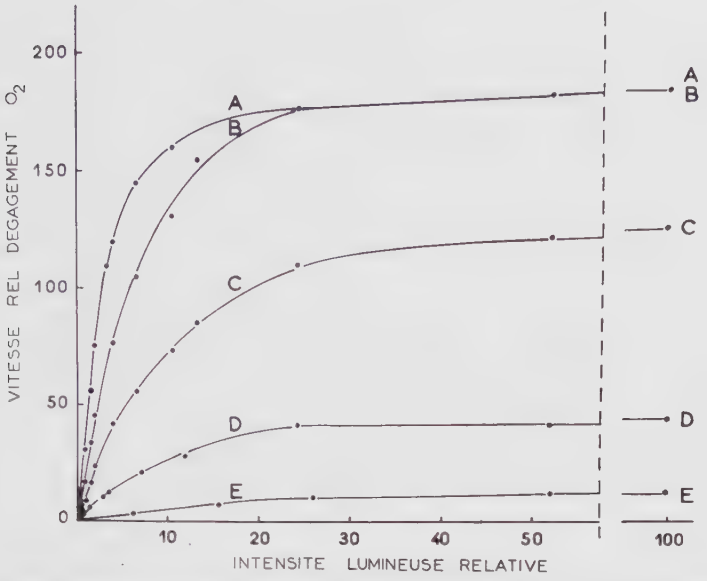


FIG. 17. — Vitesse du dégagement d'O_2 chez *Chlorella* en fonction de l'intensité lumineue, effets du CMU. Lumière blanche. Phase gazeuse, air - CO_2 (97 - 3). Concentrations de CMU : *A*, 0 ; *B*, $4 \cdot 10^{-7}$ M ; *C*, 10^{-6} M ; *D*, $4 \cdot 10^{-6}$ M ; *E*, 10^{-5} M. Temp. 20 °C.

L'inhibition en fonction de la température

Dans l'hypothèse d'une dualité de sites d'affinités différentes pour le CMU, on pouvait envisager un déplacement en fonction de la température, de l'équilibre de formation du complexe inhibiteur - intermédiaire biologique, déplacement différent suivant l'intermédiaire considéré. Dans ce cas, la variation du degré d'inhibition en fonction de la température serait différente pour la partie linéaire et pour le plateau de la courbe d'intensité lumineuse. On a donc entrepris la vérification de cette possibilité, ayant présent à l'esprit que seule sa confirmation aurait valeur de réponse. On peut imaginer en effet, que l'inhibiteur inactive le même intermédiaire (un transporteur d'électrons par exemple) participant à des réactions différentes.

La méthode de mesure d'oxygène, elle-même, a un coefficient positif de température qui correspond à une énergie d'activation d'environ 5 kcal $mole^{-1}$. Cependant il s'est avéré que ce facteur ne doit pas être pris en considération pour les mesures du dégagement photosynthétique d'oxygène. En effet, la partie linéaire de la courbe d'intensité lumineuse pour le dégagement d'oxygène est exactement superposable à toutes les températures étudiées si on emploie les résultats bruts.

En présence comme en l'absence de CMU, la portion linéaire des courbes d'intensité est insensible à la température ; l'inhibition n'y présente donc aucune sensibilité thermique. La loi d'Arrhenius a été appliquée à la détermination de l'énergie d'activation de la réaction (ou de l'ensemble de réactions) thermique (s) responsable de la saturation lumineuse en supposant que :

1° la vitesse du dégagement d'oxygène à la saturation est proportionnelle à la constante de vitesse de cette réaction,

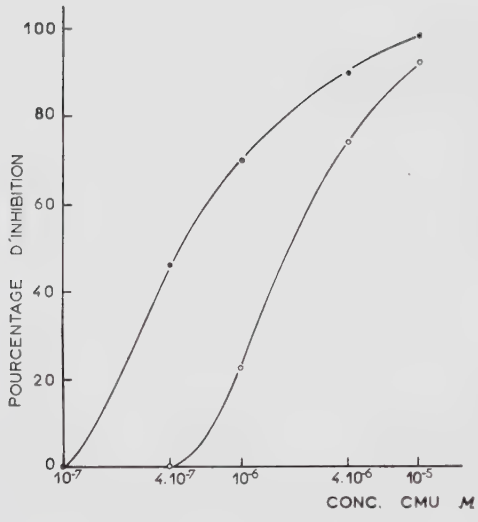


FIG. 18. — Degré d'inhibition du dégagement d'O_2 chez *Chlorella* de la partie linéaire (●———●) et du plateau (o———o) de la courbe d'intensité lumineuse en fonction de la concentration de CMU. Abscisse : échelle logarithmique. Valeurs calculées à partir des résultats de la figure 17.

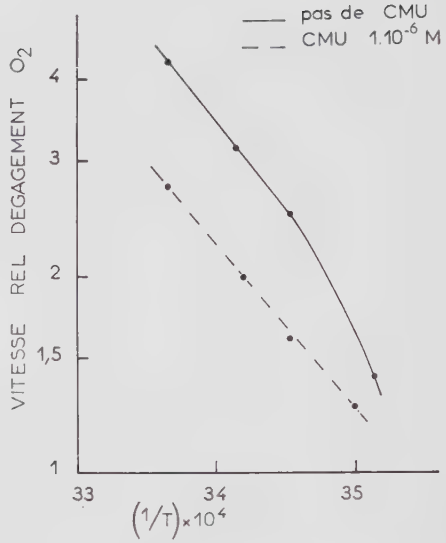


FIG. 19. — Effet de la température sur la vitesse stationnaire du dégagement d'O_2 chez *Chlorella* à la saturation lumineuse ; représentation d'ARRHENIUS. Lumière blanche. Phase gazeuse, air-CO_2 (97-3). Ordonnée : échelle logarithmique. Energie d'activation pour la partie linéaire de ces courbes, 12 kcal·mole^{-1}.

2° que la concentration du substrat de cette réaction est constante dans les limites des températures étudiées.

On a porté (fig. 19) le $\log \frac{dO_2}{dt} + \log X$ en fonction de $1/T$ (où X = vitesse relative/vitesse absolue) à la saturation lumineuse avec et sans CMU. On trouve ainsi une énergie d'activation de 12 kcal mole^{-1} entre 25 °C et 11 °C en présence de CMU et entre 25 °C et 15 °C en l'absence de CMU. Cette valeur a été obtenue également par plusieurs auteurs dont NODDACK et KOPP (1940) chez *Chlorella*. On n'observe donc, encore une fois, aucune sensibilité thermique pour l'inhibition proprement dite. L'incurvation de la courbe sans CMU au dessous de 15 °C a été observée également avec d'autres préparations (voir aussi RABINOWITCH, 1956) et s'explique par l'existence d'une succession d'étapes thermiques limitantes, ayant des énergies d'activation différentes. Mais en présence de CMU une même étape (ou série d'étapes) limite la vitesse à la saturation entre 25 °C et 11 °C.

Cette expérience ne révèle aucune sensibilité thermique de l'inhibition et ne permet donc pas de se prononcer sur l'hypothèse d'une dualité de sites d'inhibition. Elle rend plausible, en tous cas, une similitude du mécanisme d'inhibition pour les deux sites hypothétiques.

Dépendance spectrale de l'inhibition

Si les deux réactions photochimiques sont interdépendantes au point que les produits de l'une sont nécessaires au fonctionnement de l'autre, la vitesse de l'ensemble sera forcément déterminée par la plus lente des deux. De sorte que si

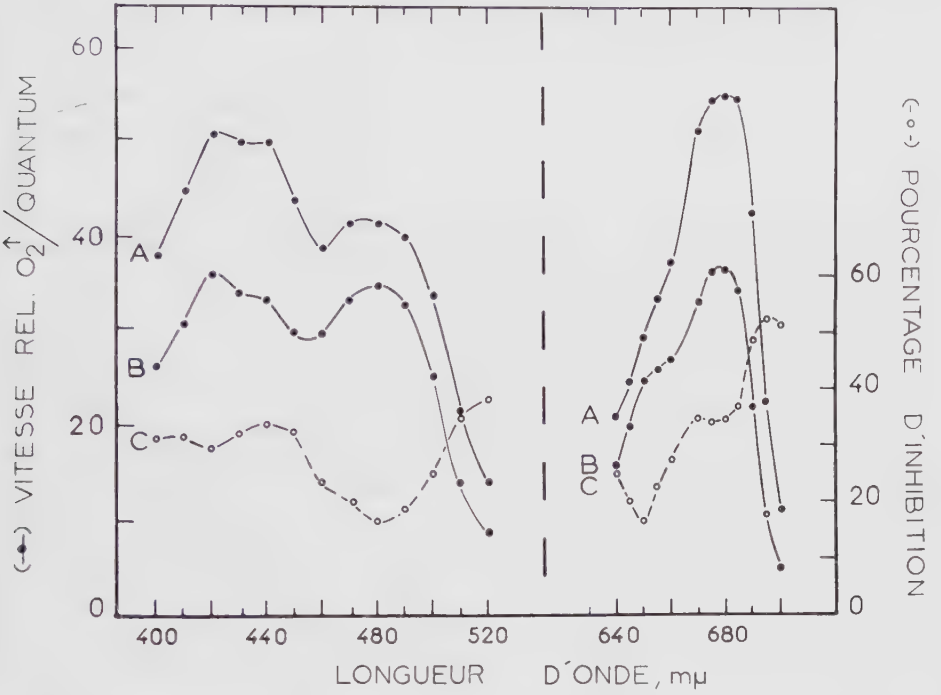


FIG. 20. — Spectre d'action du dégagement d'O_2 chez *Chlorella* sans CMU (courbe *A*) et avec du CMU, $3 \cdot 10^{-7}$ M (courbe *B*). Courbe *C* : dépendance spectrale de l'inhibition. Les deux parties de cette figure représentent des expériences séparées. Phase gazeuse, air - CO_2 (97 - 3). Temp. 20 °C.

le CMU bloque la photoréaction II, le spectre d'action du dégagement photosynthétique d'oxygène en sa présence correspondra au spectre du système II. Or d'après la dépendance spectrale de l'exaltation dichromatique (EMERSON, 1958 *b* ; MYERS et FRENCH, 1960), la vitesse de la photoréaction II est limitante vers 690 mμ et au delà, mais ne l'est pas à 650 mμ chez les algues vertes. Une inhibition de la photoréaction II doit se traduire par un ralentissement de la vitesse du dégagement d'oxygène plus marqué pour les longueurs d'onde (> 690 mμ) où la vitesse de la photoréaction II est limitante que pour les longueurs d'onde (650 mμ) où elle ne l'est pas.

La figure 20 donne le spectre d'action du dégagement d'oxygène chez *Chlorella* (courbe *A*) et celui du système II obtenu en présence de CMU (courbe *B*). La dépendance spectrale de l'inhibition (courbe *C*) présente le comportement prévu ; l'inhibition est minimum à 480 et 650 mμ, longueurs d'onde correspondante aux maximums d'absorption de la chlorophylle *b* *in vivo*. Elle est maximum vers 700 mμ. On remarque aussi un accident vers 670 mμ qui montre la participation au système II

de l'holochrome C 673. Cette dépendance spectrale confirme que le CMU inhibe la photoréaction II elle-même ou bien une réaction sombre qui en est cinétiquement voisine. La courbe *C* est une image renversée de la dépendance spectrale de l'effet d'exaltation dichromatique en présence d'une lumière de fond rouge sombre. DUYSENS et *al.* (1961) ont observé, eux aussi, une plus grande inhibition du dégagement d'oxygène chez *Porphyridium* par le DCMU à 680 mμ qu'à 560 mμ. Cet effet pourrait servir de critère commode pour la participation des deux réactions photochimiques à divers phénomènes (réaction de HILL, par exemple).

4. TENTATIVE DE LOCALISATION DU SITE D'INHIBITION. ÉTUDES CINÉTIQUES

Un bref éclair de lumière blanche, consécutif à une période prolongée à l'obscurité, ne produit aucun dégagement d'oxygène chez les algues vertes. Le même éclair, répété à intervalles rapprochés ou superposé à un faible éclairement continu, provoque, au contraire, un dégagement mesurable d'oxygène. Cette « activation » causée par un éclairement préalable persiste pendant plusieurs secondes à l'obscurité. Ces observations d'ALLEN et FRANCK (1955) furent confirmées par WHITTINGHAM et BROWN (1958) et par JOLIOT (1961). Ce phénomène d'activation ne s'obtient qu'avec des éclairs assez courts ($< 10^{-3}$ s).

Des études intéressantes ont été faites par plusieurs auteurs avec des éclairs d'environ 10^{-2} s (voir par exemple WHITTINGHAM et BISHOP, 1963) mais portent sur une étape moins primitive de la chaîne du dégagement d'oxygène. Pensant, à la suite d'ALLEN et FRANCK (1955), que l'activation des éclairs isolés doit être liée de près à l'existence des centres actifs d'EMERSON et ARNOLD (1932 *a*, *b*) (voir aussi JOLIOT, 1961) on a voulu s'en servir pour tenter de préciser le site d'action du CMU.

Ce phénomène est illustré par la figure 21. Un éclair isolé produit un dégage-

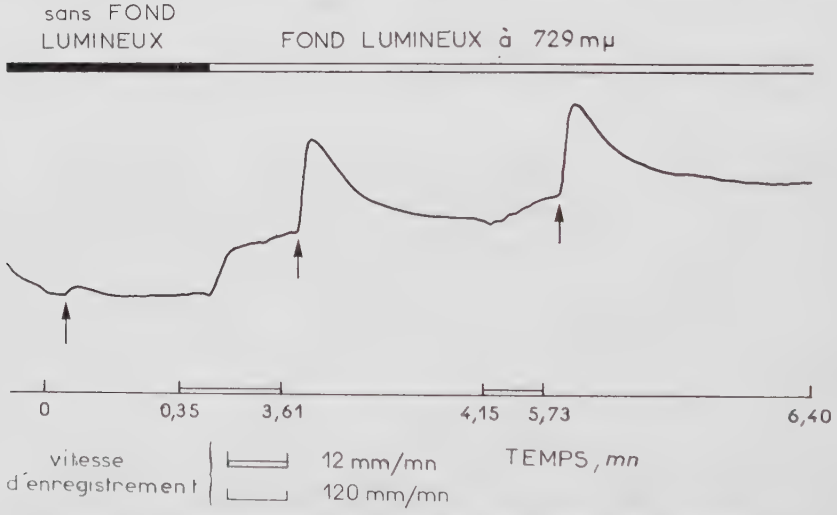


FIG. 21. — Activation, obtenue par un fond lumineux de 729 mμ, du dégagement d'O_2 (en ordonnée) produit par un éclair (↑) blanc ($2 \cdot 10^{-4}$ s) chez *Chlorella*. Intensité du fond = 3 000 ergs $\cdot cm^{-2} \cdot s^{-1}$. Phase gazeuse, air - CO_2 (98 - 2). Temp. 20 °C.

ment d'oxygène à peine mesurable, mais en présence d'un faible fond lumineux à 729 mμ, le même éclair s'accompagne d'un dégagement environ 40 fois plus important. Ce dégagement a une durée apparente de plusieurs secondes probablement explicable par l'inertie de la méthode. Pour les résultats qui suivent on a choisi la hauteur du pic (vitesse initiale) comme mesure de l'oxygène dégagé par un éclair. Cette méthode semble justifiée par la bonne corrélation trouvée entre la hauteur du pic et la surface sous-tendue par la courbe, elle même une mesure relative du volume d'oxygène dégagé. On s'est assuré dans tous les cas que l'intensité de l'éclair est saturante. Ajoutons que l'illumination activatrice préalable au déclenchement de l'éclair dure 5 mn, de façon à obtenir des valeurs stationnaires d'émission d'oxygène par l'éclair.

Courbe d'intensité de l'activation

La quantité relative d'oxygène dégagé par un éclair en fonction de l'intensité de la lumière de fond activatrice donne une courbe d'aspect classique (fig. 22). La saturation est atteinte, à une intensité incidente d'environ 1 500 ergs $cm^{-2}\ s^{-1}$ avec un fond lumineux de 729 mμ et d'environ 100 ergs $cm^{-2}\ s^{-1}$ avec un fond de 651 mμ. Cette différence tient à ce que le coefficient d'extinction de la chlorophylle est beaucoup plus grand à 651 mμ qu'à 729 mμ. Notons, aux fins de comparaison, que la photosynthèse stationnaire chez *Chlorella pyrenoidosa* à 20 °C se sature à 24 000 ergs $cm^{-2}\ s^{-1}$ à 650 mμ d'après NODDACK et KOPP (1940).

Seul le plateau de la courbe d'intensité lumineuse de l'activation est sensible à une faible concentration de CMU (fig. 22). On obtient 40 % d'inhibition en présence de CMU $1{,}5 \cdot 10^{-7}$ M et la demi-inhibition avec une concentration de $2 \cdot 10^{-7}$ M Si on considère que cette expérience a été faite en présence d'un fond lumineux

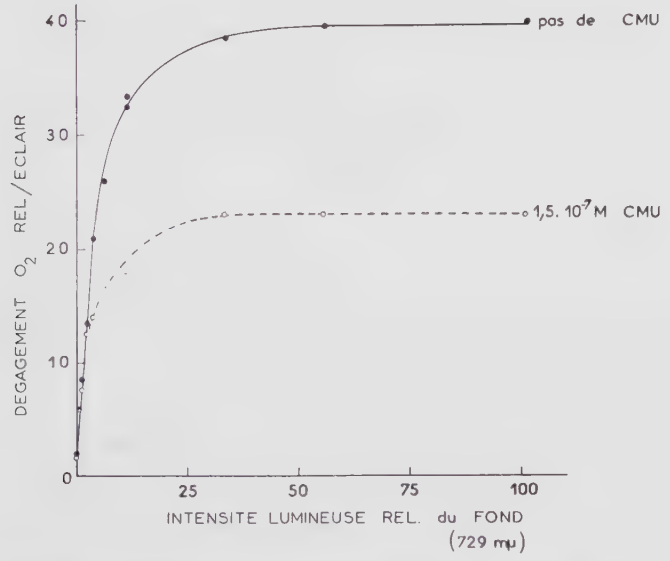


FIG. 22. — Dégagement d'O_2 produit par un éclair blanc ($2 \cdot 10^{-4}$ s) chez *Chlorella*; activation de ce dégagement par un fond lumineux (729 mμ) d'intensité croissante, avec et sans CMU. Intensité 100 = 3 000 ergs $\cdot cm^{-2} \cdot s^{-1}$. Phase gazeuse air - CO_2 (98 - 2). Temp. 20 °C.

de 729 mμ, on s'aperçoit que l'activation et la photosynthèse stationnaire en lumière limitante ont des sensibilités au CMU comparables ; la demi-inhibition de la photosynthèse stationnaire s'obtient avec une concentration d'environ $3 \cdot 10^{-7}$ M en lumière de 700 mμ de faible intensité.

Dépendance spectrale de l'activation

La hauteur du plateau de la courbe d'intensité est sensible non seulement à la température et au CMU, mais aussi à la longueur d'onde de la lumière activatrice. Le dégagement d'oxygène par éclair est minimum en présence d'un fond lumineux saturant de 650 ou de 670 mμ, il est maximum avec un fond également saturant de 700 mμ (JOLIOT, 1965 et GINGRAS et LEMASSON, 1965). On obtient une dépendance spectrale analogue à celle de l'inhibition de la photosynthèse stationnaire par le CMU (fig. 20). Ce résultat s'interprète par l'existence d'une substance intermédiaire révélée par l'éclair rapide et soumise à l'antagonisme des deux réactions photochimiques. Cette substance a été appelée « *E* » par JOLIOT (1961) d'après EMERSON et ARNOLD (1932 *b*). La concentration stationnaire de *E* est donc plus élevée lorsque la photoréaction I prédomine (activation par de la lumière rouge lointain) et plus faible lorsque la photoréaction II est plus rapide (activation par un fond lumineux de 650 ou 670 mμ).

Effet de l'anoxie

On a réduit la tension d'oxygène du milieu à sa valeur stationnaire minimum, mesurée par le dispositif de HAXO et BLINKS (1950), par entraînement à l'aide d'un mélange azote-gaz carbonique (98/2). La tension finale d'oxygène (environ 10^{-3} mmHg) est atteinte après environ 4 h. Dans ces conditions d'anoxie, non seulement l'éclair isolé ne produit-il aucun dégagement mesurable d'oxygène, mais il n'en produit pas non plus en présence d'un fond lumineux de 729 mμ et d'intensité incidente de 3 000 ergs·cm^{-2}·s^{-1}. Pour obtenir l'activation, il faut ou bien augmenter de plusieurs fois l'intensité lumineuse du fond ou bien ajouter de l'oxygène au milieu. Ces facteurs n'ont pas été étudiés systématiquement. Cependant 4 % d'oxygène ajouté au mélange azote-gaz carbonique restaure l'efficacité de l'éclair à 33 % de sa valeur mesurée en présence d'air.

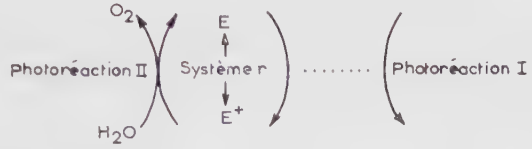
5. DISCUSSION

On a proposé ailleurs une interprétation du phénomène d'activation (GINGRAS et LEMASSON, 1965). Un résumé en sera donné ici afin d'aider à situer l'action du CMU sur le dégagement photosynthétique d'oxygène.

La substance *E*, révélée par un éclair, possède au moins deux états d'oxydo-réduction. La forme E^+ est probablement le substrat primaire de la photoréaction II : au-dessous d'une certaine durée maximum ($< 10^{-3}$ s) et à énergie lumineuse égale, l'éclair libère toujours la même quantité d'oxygène. On admet que E^+ est réduit par la photoréaction II et par un système sombre d'oxydo-réduction analogue au « système r » de GOEDHEER (1963). Après un séjour de quelques minutes à l'obscurité, E^+ est réduit par le « système r » et l'éclair électronique ne s'accompagne d'aucune émission d'oxygène. Cette émission est activée par l'oxydation préalable de *E* par la photoréaction I. L'inefficacité de l'éclair *bref* intervenant après une période

d'obscurité tient à la lenteur relative des réactions thermiques reliant les deux systèmes photochimiques ; l'éclair excite les deux systèmes pigmentaires, mais la migration vers E de l'oxydant, produit par la photoréaction I, est trop lente pour permettre le fonctionnement de la photoréaction II, avant la disparition de l'impulsion lumineuse. Une fois E^+ formé, il est réduit par la photoréaction II ou par le « système r ». La demi-vie de E^+ est d'environ 20 s (GINGRAS et LEMASSON, 1965) à l'obscurité et à 20 °C. Cette hypothèse d'oxydoréduction s'appuie sur les indices suivants : les conditions d'anoxie qui conduisent à la réduction de Q (voir chap. suivant) sont inhibitrices de l'activation ; l'expérience inverse (ALLEN et FRANCK, 1955) montre qu'en présence d'un oxydant comme la p-benzoquinone, un éclair isolé est efficace sans préillumination.

Cette hypothèse peut être schématisée comme suit ;



JOLIOT (1965), pour expliquer la dépendance de la phase de latence qu'il a mise en évidence dans la cinétique du jet d'oxygène (JOLIOT, 1961), propose un mécanisme à répétition pour la photoréaction II. Cette interprétation, qui pourrait être complémentaire de celle qu'on vient d'exposer, ne conduit pas à une conclusion sensiblement différente quant au site d'action du CMU.

Le CMU n'affecte pas la concentration stationnaire de E^+ aux intensités limitantes de la lumière activatrice (fig. 22). On en conclut que la réaction photochimique d'activation n'est pas touchée et que le CMU ne forme probablement pas un complexe inactif avec E/E^-. Dans ce cas, on s'attendrait en effet à ce que les courbes d'intensité avec et sans CMU soient homothétiques. On est donc conduit à penser que c'est l'oxydation de E par une étape thermique située entre les réactions photochimiques qui est ralentie. Le résultat est une diminution de la concentration stationnaire de E^+ et donc de la vitesse de la photoréaction II.

Ce modèle explique bien l'inhibition de la photosynthèse stationnaire aux faibles intensités lumineuses. Il rend compte aussi de la variation du degré d'inhibition avec l'intensité lumineuse (fig. 17 et 18) sans faire intervenir deux sites d'inhibition. Il suffit d'admettre que ce n'est pas la vitesse de régénération de E^+ qui est la réaction thermique responsable de la saturation lumineuse en l'absence d'inhibiteur. Alors, pour les faibles concentrations de CMU, la vitesse de dégagement d'oxygène est inhibée aux intensités limitantes. Mais, aux fortes intensités, l'inhibition n'est pas apparente parce qu'une autre réaction limite la vitesse maximum du système. Si on augmente la concentration d'inhibiteur au-dessus d'une certaine concentration ($4 \cdot 10^{-7}$ M), la vitesse de la réaction thermique touchée devient limitante et l'inhibition apparaît même aux fortes intensités lumineuses.

Si on assimile E à l'extincteur de fluorescence Q [1], le site d'inhibition proposé

[1] Q est une entité introduite par DUYSENS (1963) pour expliquer les cinétiques de fluorescence chez les végétaux photosynthétiques. Sous sa forme oxydée (Q), c'est un extincteur de fluorescence, sous sa forme réduite (QH), elle est sans effet sur le rendement de fluorescence.

ici rejoint celui suggéré par DUYSENS (1963). Notons que cette idée ressort aussi d'expériences récentes de LAVOREL (1965*b*) montrant un ralentissement par le CMU de l'oxydation à l'obscurité de l'espèce *QH*. Les cinétiques de désactivation de *E* à l'obscurité sont modifiées également par le CMU (GINGRAS et LEMASSON, 1965). Il n'est cependant pas certain que *E* et *Q* soient identiques : d'après l'interprétation avancée ici *E* est à l'état *réduit* à l'obscurité et doit être oxydé (activé) avant de servir de substrat à la photoréaction II ; d'après DUYSENS (1963) et GINGRAS et LAVOREL (1965), *Q* se trouve sous une forme oxydée à l'obscurité.

La différence d'efficacité inhibitrice du CMU et du DCMU — le DCMU est à peu près dix fois plus efficace — s'explique par une différence de leur coefficient de partition entre le chloroplaste et le milieu aqueux extérieur. Pour le CMU, ce coefficient est de 100 environ, et pour le DCMU il est de 1 300. Cela découle du travail de IZAWA et GOOD (1965) qui montre en outre qu'une molécule de CMU ou de DCMU se fixe par 2 500 molécules de chlorophylle.

Des expériences de SWEETSER (1963) et de HOMANN et GAFFRON (1964) indiquent que *in vitro*, le CMU se comporte comme un piège spécifique de l'énergie d'excitation électronique des flavines. Cela suggère que *E* pourrait être une flavine ; il sera important de s'en assurer.

VI. ÉTUDES CINÉTIQUES ET SPECTROSCOPIQUES DE LA FLUORESCENCE CHEZ *SCENEDESMUS*

1. INTRODUCTION

L'énergie lumineuse emmagasinée par un pigment sous forme de transitions électroniques, peut être transformée en énergie chimique ou bien dissipée sous forme de chaleur ou d'émission de lumière. La fluorescence de la chlorophylle *in vivo* peut donc servir d'indicateur du fonctionnement des réactions photochimiques. Aux températures ordinaires, la majeure partie de la fluorescence des végétaux est émise par le système II (DUYSENS, 1963). Lorsque la photoréaction II n'est pas fonctionnelle, comme c'est le cas pour la photoréduction, on peut prévoir des modifications des propriétés de fluorescence. Ces modifications sont susceptibles d'aider à la compréhension du mécanisme photosynthétique.

2. CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Les mesures ont été effectuées à l'aide du dispositif de LAVOREL (voir **TECHNIQUES**). L'organisme étudié, *Scenedesmus obliquus*, a été mis en suspension, à raison de 50 μg de chlorophylle par millilitre de suspension, dans une solution de $NaHCO_3 \cdot 10^{-2}$ M additionnée des oligoéléments du milieu de culture. Les atmosphères gazeuses suivantes ont été employées : pour les mesures en aérobiose, de l'air ; pour les mesures en anaérobiose de l'azote contenant moins de 10 vpM d'oxygène ou de l'hydrogène débarrassé de ses traces d'oxygène ($<$ 5 vpM) par passage sur catalyseur « DEOXO ». Les expériences ont été faites à la température ambiante d'environ 23 °C. Sauf mention contraire, la fluorescence a été excitée à 480 mμ et analysée à 700 mμ.

3. PROPRIÉTÉS D'INDUCTION DE FLUORESCENCE

Dans le dispositif d'écoulement de LAVOREL, une interruption brusque de la circulation de la suspension d'algues est équivalente à une illumination soudaine de la suspension. On peut obtenir ainsi une image de l'évolution de la fluorescence dans les quelques instants qui suivent la mise à la lumière. La figure 23*a* montre le type

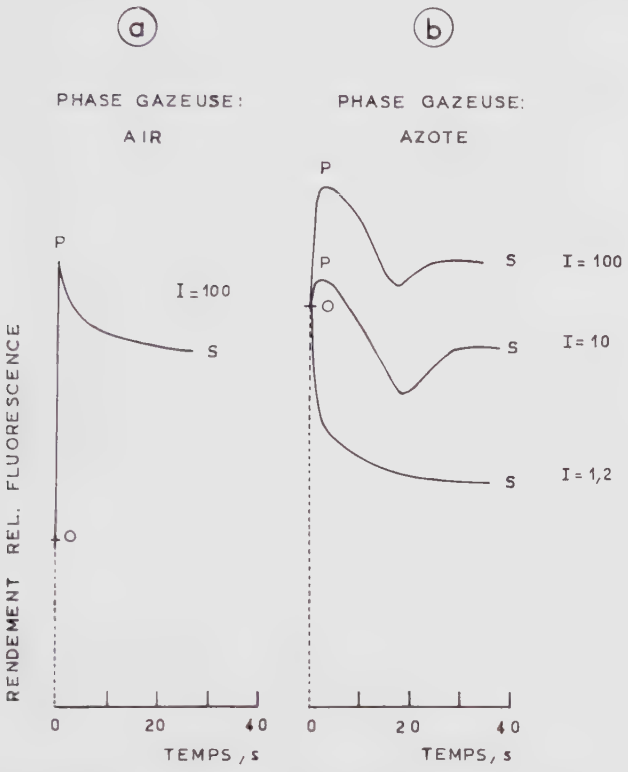


FIG. 23. — Courbes d'induction du rendement relatif de fluorescence en aérobiose (*a*) et en anaérobiose (*b*) à différentes intensités *I* d'excitation chez *Scenedesmus*.

d'induction de l'émission de fluorescence classique chez les végétaux photosynthétiques en aérobiose (effet KAUTSKY). Cette cinétique comporte une partie fixe et une partie qui varie au cours du temps. En présence d'une intensité lumineuse relativement forte (de l'ordre de 10^4 ergs·cm^{-2}·s^{-1}), le rendement de fluorescence, part d'un niveau initial *O* préexistant à toute action photochimique (partie fixe), croît rapidement vers un maximum *P*, pour ensuite décroître lentement, vers le niveau stationnaire *S*. On adoptera ici cette désignation *O*, *P*, *S*, due à LAVOREL (1959). La méthode d'écoulement intermittent a permis de suivre l'évolution en anaérobiose des niveaux *m* et *M* respectivement voisins de *O* et de *P* et obtenus durant la phase d'écoulement (*m*) ou d'arrêt (*M*) (fig. 24).

En présence d'air, les niveaux *m* et *M* sont éloignés l'un de l'autre et reflètent la cinétique $O \rightarrow P$ de la figure 23*a*. A mesure que diminue la tension partielle d'oxygène, par entraînement par un courant d'azote, le niveau *m* s'élève jusqu'à un état stationnaire. Puis l'addition d'hydrogène provoque rapidement l'établissement d'un nouvel état stationnaire de *m* plus élevé que les deux autres et voisin du niveau *M*. Si l'on introduit, de nouveau, de l'air dans la suspension on assiste à une chute rapide du niveau *m* jusqu'à sa valeur initiale. Le niveau *M* subit, au cours de ce traitement, des variations de moindre amplitude qu'on ne tentera pas d'interpréter ici. Les expériences qui suivent ont toutes été effectuées après stabilisation du niveau *m* à sa valeur stationnaire sous azote ou sous hydrogène.

L'observation précédente montre que le niveau *m* s'élève lorsque les conditions deviennent réductrices. Elle permet en même temps d'associer la phase $O \rightarrow P$, déclenchée par l'illumination, à une réduction, le point *O* correspondant à un état oxydé et le point *P* à un état réduit. C'est ce que proposent Duysens et Sweers (1963).

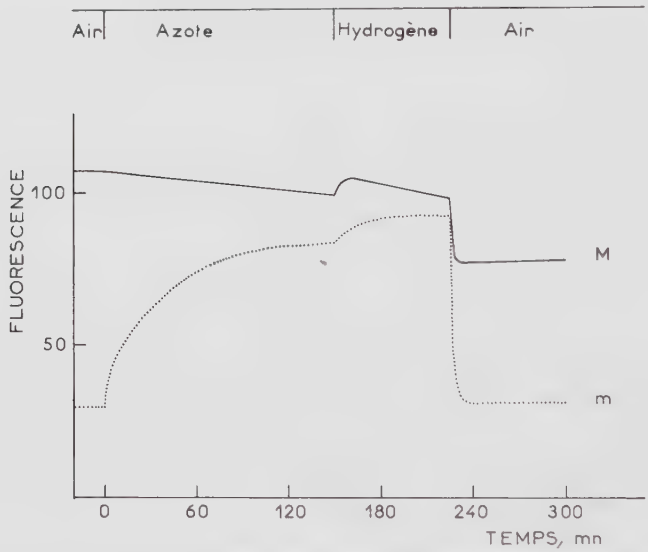


Fig. 24. — Evolution au cours du temps des niveaux de fluorescence *m* et *M* chez *Scenedesmus* en présence de diverses atmosphères gazeuses. Les niveaux *m* et *M* correspondent respectivement à la phase d'écoulement et d'arrêt de la suspension d'algues.

D'après eux, le substrat, « *Q* », de la photoréaction II est oxydé à l'obscurité et c'est sa réduction par la photoréaction II qui explique la phase $O \rightarrow P$ de fluorescence (voir aussi Lavorel, 1964).

Le même résultat est présenté par la figure 23*b*, sous forme de courbes d'induction de fluorescence, en présence d'azote et à diverses intensités lumineuses d'excitation. Ces cinétiques — obtenues, comme celle de la figure 23*a*, par arrêt de la circulation — ont en commun un niveau initial, *O*, de fluorescence très élevé, en net contraste avec celui de la figure 23*a*. Kautsky et Franck (1943) ont également observé un maximum de fluorescence au temps zéro chez *Ulva* en présence d'azote. On notera aussi (fig. 23*b*) les modifications de la cinétique de l'induction apportées par une variation de l'intensité lumineuse d'excitation. A mesure que l'intensité

décroît (Intensités relatives 100 et 10), la phase $O \rightarrow P$ diminue d'amplitude jusqu'à disparaître (Intensité 1,2). On aboutit (Intensité 1,2) à une cinétique où la fluorescence, maximum au temps zéro (O), décroît ensuite jusqu'à un état stationnaire (S). On appellera $O \rightarrow S$ cette cinétique particulière. L'effet de l'intensité lumineuse sur l'induction de fluorescence en anaérobiose a été décrit ailleurs (GINGRAS et LAVOREL, 1965) ; aussi ne traiterai-je ici que des cinétiques obtenues avec de faibles intensités.

Dans ces conditions, les cinétiques obtenues en anaérobiose sont inversées par rapport aux cinétiques habituelles ; l'illumination provoque une diminution du

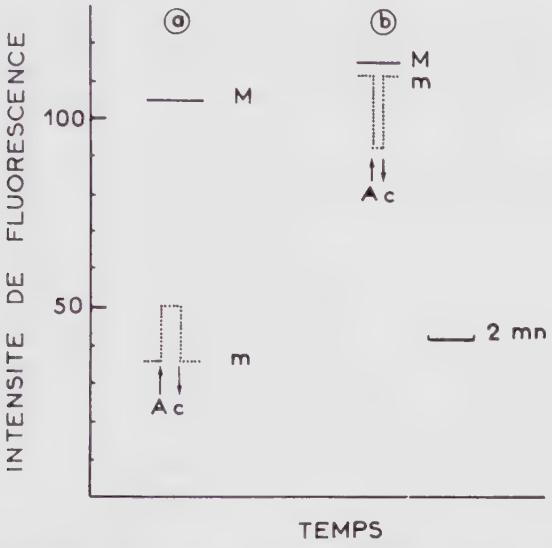


FIG. 25. — Reproduction de l'enveloppe d'un enregistrement, montrant l'effet d'une préillumination courte (*Ac*) sur l'intensité *m* et *M* de fluorescence chez *Scenedesmus*. Les niveaux *m* et *M* correspondent respectivement à la phase d'écoulement et d'arrêt de la suspension d'algues. *a*) Phase gazeuse, air. *b*) Phase gazeuse, H_2.

rendement de fluorescence alors qu'elle l'augmente en aérobiose. Ce phénomène est illustré de façon plus frappante encore par l'expérience suivante. La suspension est illuminée brièvement ($2{,}5 \cdot 10^{-2}$ s) dans une cavité spéciale sur le capillaire d'écoulement $1{,}4 \cdot 10^{-2}$ s avant l'analyse de fluorescence. De cette manière, l'action photochimique précède la mesure de fluorescence. En présence d'air, cette préillumination produit une augmentation du niveau *m* (fig. 25*a*) ; en présence d'hydrogène, au contraire, elle déprime le niveau *m* (fig. 25*b*).

Dépendance spectrale de la phase $O \rightarrow S$ en présence d'H_2

Si le niveau initial de fluorescence varie proportionnellement à l'intensité de réduction du substrat photochimique Q, la cinétique $O \rightarrow S$ observée en anaérobiose doit correspondre à une oxydation de Q. Cette réaction est provoquée par la lumière, agissant probablement au niveau de la photoréaction I (DUYSENS et

Sweers, 1963). C'est pour vérifier cette hypothèse qu'on a déterminé la dépendance spectrale de la phase $O \rightarrow S$ en présence d'hydrogène.

Cette mesure a été faite de la manière suivante. Pour chaque longueur d'onde, on a choisi une intensité du faisceau d'analyse propre à donner un niveau m constant. Si on admet que la quasi-totalité de la fluorescence initiale est émise par les pigments du système II, le rendement de cette fluorescence doit être pratiquement invariable en fonction de la longueur d'onde d'excitation. Dans cette hypothèse, la hauteur du niveau m ne dépend que de l'intensité lumineuse absorbée par le système II et un niveau m constant traduit une absorption égale en fonction de la longueur d'onde. Cette hypothèse a été vérifiée par Lavorel (1964).

Ensuite, on mesure la vitesse initiale de la chute de rendement de fluorescence (fig. 23*b* courbe $I = 1{,}2$) $O \rightarrow S$ en fonction de la longueur d'onde. Grâce au régime d'écoulement intermittent, on obtient ainsi des valeurs m et M correspondant respectivement aux temps t_0 et t_1, de la cinétique. Le régime d'écoulement étant constant et le temps d'arrêt assez court, on obtient une mesure de la vitesse initiale de la phase $O \rightarrow S$.

La figure 26 montre que cette phase $O \rightarrow S$ est plus lente aux longueurs d'onde 480, 650 et 670 mμ et nettement plus rapide au-delà de 700 mμ. Ce spectre, comparable à la dépendance spectrale de l'inhibition par le CMU (chap. V) et à celle de

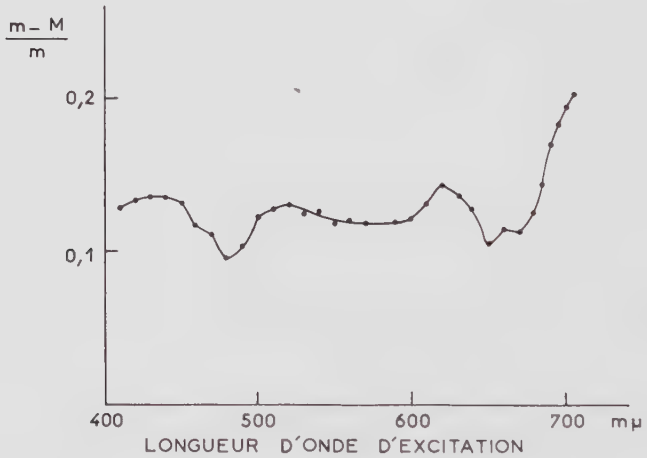


Fig. 26. — Dépendance spectrale de la diminution initiale ($O \rightarrow S$) du rendement de fluorescence chez *Scenedesmus*, en présence d'H_2. Cette diminution est exprimée par le rapport $\frac{m-M}{m}$. Les niveaux m et M correspondent respectivement à la phase d'écoulement et d'arrêt de la suspension d'algues. Observation de la fluorescence à 750 ± 20 mμ.

l'état stationnaire de la substance hypothétique E (Joliot, 1965 ; Gingras et Lemasson, 1965), présente une image inversée des spectres d'exaltation dichromatique du dégagement d'oxygène tels que les ont décrits Myers et French (1960). On en conclut que la réaction responsable de la phase $O \rightarrow S$ est sous la dépendance du système I ; le spectre de la figure 26 est donc celui du rapport des absorptions des

deux systèmes. Le résultat obtenu est compatible avec l'hypothèse suivant laquelle la phase $O \rightarrow S$ correspond à une oxydation de Q par la photoréaction I.

Effet de la 3-(4-chlorophényl)-1,1-diméthylurée (CMU)

Suivant l'état d'oxydo-réduction du substrat de la photoréaction II, on obtient des cinétiques d'induction de fluorescence de type $O \rightarrow P \rightarrow S$ caractéristique de l'aérobiose ou de type $O \rightarrow S$ caractéristique de l'anaérobiose. Cet état d'oxydo-réduction de Q est modifiable par la qualité de l'atmosphère gazeuse, par une préillumination, ou par rupture de communication entre les réactions photochimiques (Gingras et Lavorel, 1965). Même si Q est presque complètement réduit, comme c'est le cas sous hydrogène, un éclairement assez fort donne naissance à des courbes d'induction comme celles de la figure 23*b* ($I = 100$ ou $I = 10$). En présence de CMU, les cinétiques obtenues avec de faibles intensités lumineuses sont du même type $O \rightarrow P \rightarrow S$. Ce genre de cinétique s'explique par l'existence d'étapes thermiques entre les deux réactions photochimiques. A forte intensité lumineuse, ces étapes sont lentes devant les vitesses photochimiques, de sorte que Q est d'abord soumis à l'action de la réaction photochimique la plus rapprochée, la photoréaction II. Cela est vrai, même si Q est presque complètement réduit. Lorsque Q est réduit et pour un faible éclairement, la vitesse de ces étapes thermiques n'est plus limitante et l'oxydation par la photoréaction I est prépondérante sur la réduction. Mais le CMU ralentit la vitesse d'oxydation de Q, par la photoréaction I, de sorte que même à faible intensité lumineuse on obtient une cinétique $O \rightarrow P \rightarrow S$.

L'action du CMU se manifeste sur des réactions rapides comme celle que nous venons de voir ou encore sur la cinétique $P \rightarrow O$ (Lavorel, 1965*b*), mais aussi sur des réactions lentes (Gingras et Lemasson, 1965). L'introduction d'air dans la suspension d'algues, après plusieurs heures sous hydrogène, entraîne un retour rapide du niveau m à son état initial (fig. 24). La demi-décroissance s'effectue en 90 s. En présence de CMU (10^{-4} M), on trouve un temps de demi-décroissance de 430 s. Cette observation s'explique, encore une fois, par une coupure introduite par le CMU entre Q et un réservoir d'oxydant, lui-même en communication avec l'oxygène.

4. HÉTÉROGÉNÉITÉ DE L'ÉMISSION DE FLUORESCENCE

On a admis que la majeure partie de la fluorescence est émise par les pigments du système II. Si cette émission ne provenait que d'un seul système pigmentaire, elle devrait demeurer spectralement constante quel que soit son rendement. C'est ce qu'on a voulu vérifier.

La figure 27 donne le spectre d'émission des niveaux m et M en présence d'air. Aucune correction n'ayant été faite pour l'auto-absorption lumineuse des cellules, le sommet de ce spectre est déplacé de 685 mμ, sa position normale, à 690 mμ. On y remarque des épaulements à 720 et 750 mμ. Ce spectre est comparable à ceux qu'a obtenu Lavorel (1962) chez *Chlorella*.

Si on fait le rapport des spectres d'émission M/m en aérobiose et $m\,H_2/m$air on obtient les courbes de la figure 28. Ce rapport varie en fonction de la longueur d'onde et présente des maximums vers 670 - 680 mμ et vers 750 mμ et un minimum

centré vers 720 mμ. Cette hétérogénéité de l'émission de fluorescence a également été observée en aérobiose pour le rapport P/O et P/S par LAVOREL (1962) et pour le rapport P/S par ROSENBERG et *al.* (1964).

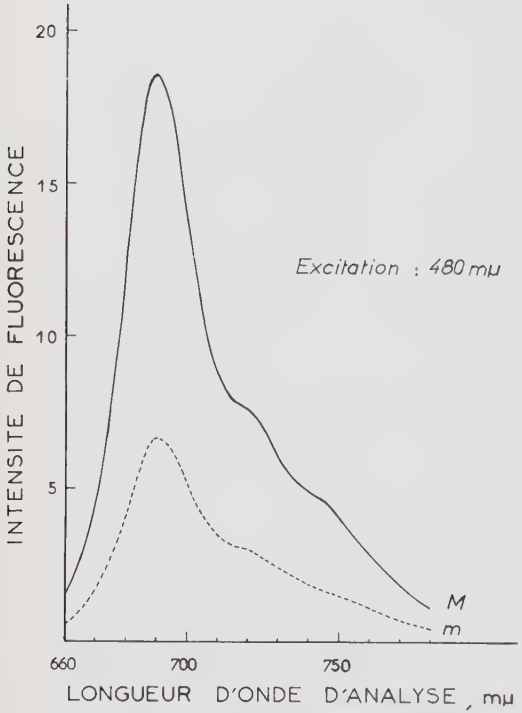


FIG. 27. — Spectre d'émission de fluorescence de *Scenedesmus* en présence d'air pour les niveaux *m* et *M*. Le maximum du spectre est décalé de 5 mμ vers les grandes longueurs d'onde à cause de l'auto-absorption cellulaire. Les niveaux *m* et *M* correspondent respectivement à la phase d'écoulement et d'arrêt de la suspension d'algues.

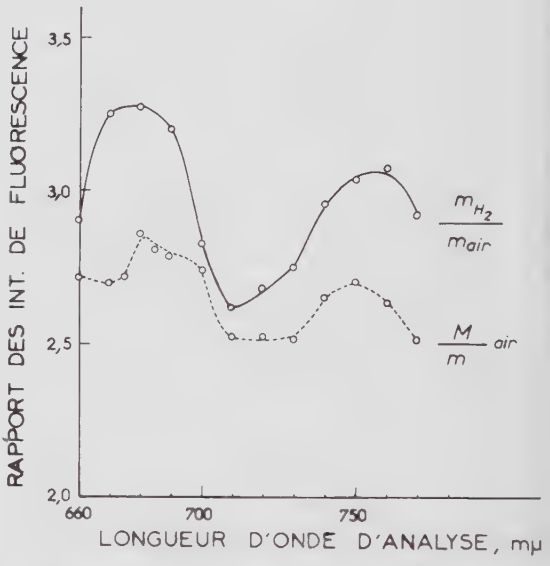


FIG. 28. — Variation spectrale du rapport de deux niveaux, *m* et *M*, de la cinétique initiale de l'émission de fluorescence chez *Scenedesmus*. Les niveaux *m* et *M* correspondent respectivement à la phase d'écoulement et d'arrêt de la suspension d'algues.

LAVOREL (1962) admet que la partie constante de fluorescence (O) en aérobiose est composée d'une émission à 685 et à 750 mμ et d'une émission à 720 mμ. La première (685 + 750 mμ) subirait une augmentation relative plus grande que la seconde (720 mμ) durant le passage du niveau O au niveau P.

Cependant, comme LAVOREL me l'a fait remarquer, cette situation devrait donner lieu à un rapport constant à toutes les longueurs d'ondes sauf vers 720 mμ où l'on observerait un minimum. Or les courbes de la figure 28 ne se conforment pas à cette prédiction. On peut tourner cette difficulté de deux façons. La première consiste à admettre que la différence entre la théorie et l'expérience n'est pas significative ; il est certain que les mesures faites aux extrémités du spectre sont moins précises que les autres. Cependant l'excellente concordance du spectre de rapport

$m\mathrm{H_2}/m$air avec ceux de ROSENBERG et *al.* (1964) pour P/S, déterminés par une technique différente, m'incite plutôt à compléter la théorie.

Si les résultats sont significatifs, ils peuvent s'interpréter par l'existence d'une bande de fluorescence vers 700 mμ en plus de la bande à 717 mμ. Cette bande à 700 mμ, observée chez *Scenedesmus* à 77 °K, a été attribué par KOK (1963) au pigment C700. Si l'on admet que cette bande s'étend jusque vers 660 mμ et que ses variations d'intensité ne sont pas de même sens que celles de l'émission à 685, 750 mμ, on peut expliquer qualitativement les variations spectrales du rapport $m\mathrm{H_2}/m$air. On supposera qu'en présence d'air, le rapport M/m indique une prédominance de l'émission à 685, 750 mμ pour le niveau M. Le rapport $m\mathrm{H_2}/m$air traduirait non seulement une émission relativement plus intense à 685, 750 mμ mais aussi une émission plus faible à 700 mμ, en présence d'hydrogène. L'intervention d'une bande à 700 mμ pourrait rendre compte de la position du maximum du rapport $m\mathrm{H_2}/m$air vers 670-680 mμ et de la chute de ce rapport vers les courtes longueurs d'onde. Dans tous les cas l'émission à 717 mμ resterait relativement constante.

Il convient de noter qu'une variation d'une partie de l'émission à 700 mμ ou à 717 mμ, parallèle à la variation de l'émission principale (685, 750 mμ) serait indécelable par la méthode des rapports.

5. DISCUSSION

Ces expériences donnent des indications sur le mécanisme d'induction de la fluorescence et sur celui de la photoréduction. Elles permettent également de préciser certaines hypothèses quant à la régulation du transport d'électrons et du transfert de l'énergie d'excitation entre les pigments.

L'existence d'un accepteur d'électrons, Q, substrat primaire de la photoréaction II et soumis à l'antagonisme des deux réactions photochimiques (DUYSENS, 1963), rend compte de la plupart des phénomènes d'induction qu'on vient de décrire. Il semble également raisonnable d'admettre que l'émission de fluorescence provient de la masse photoréceptrice de la chlorophylle. L'énergie lumineuse absorbée par cette masse est transférée vers des centres d'utilisation déterminés, par exemple, par la présence de Q. Lorsque Q est à l'état réduit, les centres actifs ne sont pas disponibles et l'énergie non utilisée pourra être acheminée vers d'autres centres ou réémise, en partie, sous forme de fluorescence. Au contraire, lorsque Q est à l'état oxydé, il peut servir d'accepteur d'électrons et se comporte alors comme un extincteur de fluorescence.

Aux températures ordinaires, on peut considérer que l'émetteur principal de fluorescence est constitué par les pigments du système II. Cependant la fluorescence des pigments du système I n'est sans doute pas nulle ; on peut, en tout cas, la mettre en évidence à basse température (BRODY, 1958 et KOK, 1963). Si on suppose que la fluorescence du système I évolue de manière analogue à celle du système II, on arrive à l'hypothèse suivante. Lorsque P700 est réduit (forme colorée), la fluorescence du système I est minimum ; lorsqu'il est oxydé (forme décolorée) l'émission est maximum. On sait qu'en *aérobiose*, à l'obscurité, Q est oxydé et P700 réduit, ce qui donne un minimum d'émission de la part des deux systèmes pigmentaires au niveau O de fluorescence ; en aérobiose encore, mais après quelques instants d'illumination (niveau P de fluorescence), Q est réduit et P700 oxydé, ce qui doit provoquer une plus grande émission des deux systèmes pigmentaires. Pour expliquer la variation

spectrale du rapport M/m il faut cependant admettre que les deux émissions n'évoluent pas de façon parallèle. C'est ce qui se produira si la vitesse nette d'oxydation de P700 est moins grande que celle de la réduction de Q à cause, par exemple, de l'existence d'un mécanisme cyclique de transport d'électrons impliquant P700.

En présence d'hydrogène, Q et P700 sont réduits à l'obscurité d'où une émission de fluorescence relativement beaucoup plus riche en composante système II (685, 750 mμ) au niveau O qu'en composante système I (700, 717 mμ). C'est ce que traduit le rapport $m\mathrm{H}_2/m$air de la figure 28, puisque, en aérobiose et à l'obscurité, Q est oxydé et P700 réduit. Le rapport $M\mathrm{H}_2/m\mathrm{H}_2$ varie très peu, mais il est plus élevé de 690 à 730 mμ. On l'explique comme suit : à l'obscurité (niveau m), l'émission du système II est prépondérante puisque Q et P700 sont réduits. A la lumière (niveau M), Q et P700 tendent à s'oxyder d'où une augmentation relative de l'émission du système I. L'interprétation de la *forme* du rapport $m\mathrm{H}_2/m$air repose sur une base expérimentale encore maigre. Une étude détaillée de ce phénomène s'impose, de toute évidence. Une conclusion importante paraît quand même se détacher de cette étude : lorsque les pièges Q ne sont pas réceptifs, par suite d'une réduction par l'hydrogène (niveau m H_2) ou par la photoréaction II (niveau M air), l'émission de fluorescence à 685, 750 mμ est davantage stimulée qu'aux autres longueurs d'onde. Cela constitue une raison de plus pour attribuer cette émission (685, 750 mμ) aux pigments du système II.

En ce qui concerne les cinétiques de l'induction de fluorescence, on n'observe que des différences d'ordre quantitatif entre photoréduction et anaérobiose. Sous cet aspect, l'adaptation à l'hydrogène chez *Scenedesmus* n'apparaît que comme un prolongement du métabolisme anaérobique. Pour expliquer cette ressemblance, il faut supposer que Q est réduit en anaérobiose par un métabolisme obscur. Ce métabolisme serait analogue au « système r » de Goedheer (1963) qu'on a fait intervenir (chap. V) pour expliquer la décroissance à l'obscurité de l'activation du dégagement d'oxygène par un éclair. Ce système r est sans doute responsable de la réduction de Q en présence d'hydrogène aussi bien qu'en présence d'azote. En effet, si le CMU agit bien entre Q et la photoréaction I, une réduction directe de Q par l'hydrogène paraît tout à fait improbable, puisque dans ce cas la photoréduction serait inhibée par le CMU. Ajoutons que Gaffron (1940) a montré que l'adaptation à l'hydrogène se fait aussi bien en atmosphère d'azote qu'en atmosphère d'hydrogène.

A ce propos, la vitesse d'augmentation du niveau m de fluorescence, après introduction d'azote dans la suspension d'algues (fig. 24), n'indique pas la vitesse d'adaptation à l'hydrogène. Elle n'indique que la vitesse d'entraînement de l'oxygène par le courant d'azote : on obtient des cinétiques différentes en faisant varier le volume de la suspension. La courbe d'augmentation du niveau m atteint un état stationnaire après 2 h environ ; cependant, après introduction d'air, la chute du niveau m se produit en quelques minutes. Une très petite concentration d'oxygène suffit donc à oxyder Q. Il est certain que la vitesse de l'augmentation de m, après mise de la suspension sous atmosphère d'azote, reflète la vitesse de la diffusion des gaz ; il est possible que la vitesse de la chute de m après introduction d'air soit, elle aussi, limitée par la diffusion. Cependant l'inhibition de cette dernière réaction par le CMU correspond à un phénomène biologique. Le CMU bloque l'oxydation de Q par une réaction sombre qui est, ou bien une auto-oxydation de Q, ou bien une oxydation indirecte par l'intermédiaire d'oxydants, eux-mêmes en contact avec l'oxygène.

VII. DISCUSSION GÉNÉRALE

Je tâcherai de dégager ici les principales conclusions qui découlent de ce travail ; je discuterai ensuite de celles qui paraissent les plus importantes pour la compréhension du mécanisme photosynthétique.

Les étapes initiales de la fixation du carbone sont les mêmes pour la photosynthèse aérogène, pour la photoréduction et pour un processus sombre, la réaction oxhydrogène. Une des implications de ces observations est que l'absorption de l'hydrogène ne nécessite pas l'intervention de la photochimie. Le CMU, un inhibiteur du dégagement d'O_2, sans effet sur la photoréduction, bloque le transport d'électrons entre les deux réactions photochimiques et empêche ainsi la recharge, par la photoréaction I, du substrat de la photoréaction II. L'inefficacité du CMU, l'absence d'exaltation dichromatique et les spectres d'action indiquent que la photoréduction ne nécessite que l'intervention de la photoréaction I. La comparaison des spectres d'absorption et d'action révèle, en photoréduction, l'existence de transferts d'énergie électromagnétique du système II vers la photoréaction I. Enfin, les cinétiques d'émission de fluorescence montrent que le substrat Q de la photoréaction II peut être réduit, indirectement, par l'hydrogène. La réduction de Q, aussi bien par la photoréaction II que par l'hydrogène, se traduit par une stimulation de l'émission de fluorescence du système II.

Deux questions seront discutées :

1° les relations de transfert d'énergie entre systèmes photochimiques et la composition pigmentaire de ces systèmes ;

2° le mécanisme de conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique stable, emmagasinée dans la liaison C - C, par exemple.

1. SYSTÈMES PIGMENTAIRES, COMPOSITION ET TRANSFERTS D'ÉNERGIE

La concordance parfaite du spectre d'action de la photoréduction et du spectre d'absorption dans le rouge, chez *Porphyridium*, m'a amené à suggérer (cf GINGRAS, 1965) qu'en présence d'hydrogène tous les pigments peuvent sensibiliser la photoréaction I. Cette concordance devra, évidemment, être soigneusement vérifiée chez d'autres espèces avant qu'on puisse en tirer des conclusions définitives. Elle paraît, en tout cas, difficilement explicable autrement. Il suffirait qu'une fraction de l'holochrome C673, par exemple, ne sensibilise que la photoréaction II pour que le spectre d'absorption et le spectre d'action de la photoréaction I ne soient pas homothétiques dans le rouge. Un autre argument porte sur les efficacités relatives des phycobilines, par rapport à celle de la chlorophylle, comme sensibilisateurs de la photoréaction I. On sait que les holochromes chlorophylliens absorbant dans le rouge sombre sensibilisent beaucoup plus efficacement la photoréaction I que la photoréaction II : on peut estimer pour simplifier, que 90-95 % de l'énergie absorbée à 695 mμ est utilisée par la photoréaction I chez *Porphyridium*.

Supposons que les phycobilines forment deux fractions séparées, l'une sensibilisant uniquement la photoréaction I et l'autre, très importante comme l'indique

la dépendance spectrale de l'exaltation dichromatique (EMERSON, 1958*b*), ne sensibilisant que la photoréaction II. Les rapports des efficacités relatives pour la photoréduction, phycoérythrine/chlorophylle et phycocyanine/chlorophylle, doivent dans ce cas être inférieurs aux efficacités de transfert phycoérythrine → phycocyanine et phycocyanine → chlorophylle. Ces valeurs sont d'environ 85 % et 100 % d'après DUYSENS (1952). Or les efficacités relatives, mesurées d'après le spectre d'action de la photoréduction, correspondent presque exactement aux valeurs de DUYSENS. Il faut donc admettre que les phycobilines se comportent comme une fraction unique à l'égard de la photoréduction.

On admettra donc qu'en présence d'hydrogène tous les pigments peuvent sensibiliser la photoréaction I. Cette hypothèse, appliquée aux algues vertes, expliquerait la présence, dans les spectres d'action de la photoréduction chez *Scenedesmus*, d'accidents correspondant à la chlorophylle *b* et aux holochromes C673 et C683. Les accidents vers 670 et 680 mμ n'apparaissent pas dans les spectres d'action de la photosynthèse parce que, dans ce cas, chacun des holochromes, C673 et C683, excite une réaction photochimique différente dont le fonctionnement simultané est nécessaire à l'observation du phénomène global. Le spectre d'action de la photosynthèse correspond ainsi à l'excitation optimale des deux photoréactions. En photoréduction, au contraire, les spectres d'action — lorsque leur résolution chromatique est suffisante — font apparaître des maximums correspondant à l'excitation de chacun des sensibilisateurs, puisqu'une seule photoréaction est en jeu.

La partie inférieure de la figure 29 schématise les voies possibles des transferts

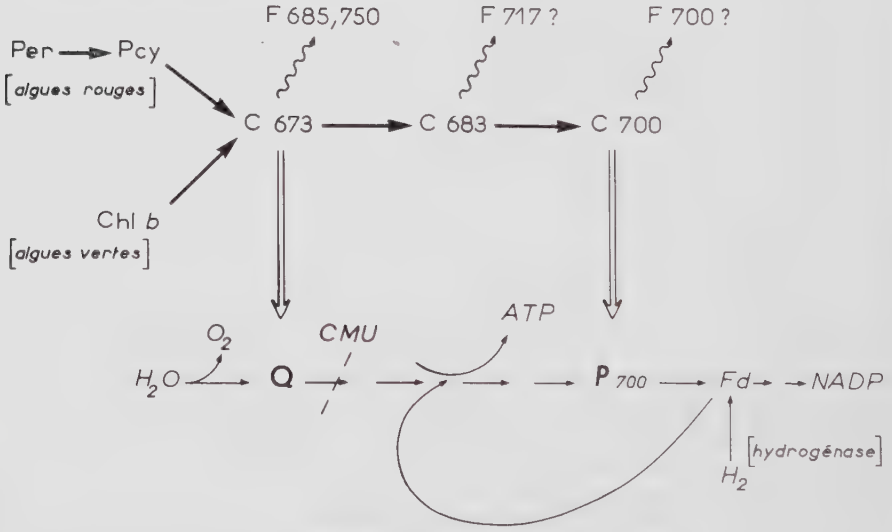


FIG. 29. — Schéma résumant les principales hypothèses de ce travail.

Chl b : chlorophylle *b* ; C 673, C 683 et C 700 : holochromes à chlorophylle *a*, définis par leurs maximums d'absorption dans le rouge. F 685, 750, F 717, F 700 : maximums des bandes d'émission de fluorescence. *Per* et *Pcy* : phycoérythrine et phycocyanine. P 700 et Q : effecteurs des photoréactions I et II. *Fd* : ferredoxine ——→ relations possibles de transferts d'énergie photique entre pigments.

——→ : transferts électroniques,

∿∿→ : émission de fluorescence.

d'énergie chez les algues rouges ou vertes. En photoréduction, l'énergie absorbée par les « pigments accessoires », chlorophylle *b* chez les algues vertes, phycoérythrine et phycocyanine chez les algues rouges, serait transférée à l'holochrome C673, puis à la photoréaction I par l'intermédiaire de C683 et de C700.

Prenant pour acquis ce mécanisme pour la photoréduction, on essaiera maintenant d'en déduire les modalités des transferts en photosynthèse aérogène. Deux possibilités peuvent être envisagées :

1° Il existe deux systèmes pigmentaires complètement cloisonnés au point de vue des transferts d'énergie en photosynthèse aérogène ; c'est le long séjour des algues en milieu anoxique qui provoque un changement dans la structure des systèmes pigmentaires, et rend possible, en photoréduction, les transferts du système II vers le système I. Cette hypothèse est à vérifier mais ne sera pas développée ici. En effet, la seconde hypothèse permet d'éclairer sous un jour différent les relations de transferts entre les systèmes pigmentaires, et de comprendre certains phénomènes mal expliqués par la première.

2° Le séjour anoxique des algues ne provoque pas de changements déterminants dans la structure des systèmes pigmentaires mais agit plutôt au niveau des centres réactionnels. C'est parce que les centres réactionnels du système II ne sont pas disponibles en présence d'hydrogène et de CMU, que l'énergie est dirigée vers ceux du système I, alors réceptifs.

Si l'on étend cette hypothèse à la photosynthèse aérogène, on peut dire que l'énergie arrivant à C673 est dirigée soit vers les pièges de la photoréaction II soit vers ceux de la photoréaction I suivant l'état de ces pièges. Cette théorie des « systèmes communiquants » (« spillover ») n'est pas nouvelle, elle a été proposée par Kok (1963) et par Myers (1963), entre autres.

Cette hypothèse peut rendre compte non seulement des spectres d'action de la photoréduction, mais aussi des effets d'exaltation dichromatique et de plusieurs des propriétés de fluorescence des végétaux photosynthétiques. Dans les conditions où la vitesse de l'une des réactions photochimiques est limitante par rapport à l'autre, les systèmes pigmentaires pourront se comporter comme s'ils étaient séparés. Lorsque la vitesse de la photoréaction II est limitante (en présence de CMU ou d'un fond lumineux rouge sombre, par exemple), le spectre d'action du dégagement d'oxygène fera apparaître les « pigments accessoires » et C673. La vitesse de la photoréaction I peut être limitante lorsqu'on excite les « pigments accessoires », si les transferts C673 → P700 ne sont pas efficaces à 100 % ou si la phosphorylation cyclique exige le transport de deux électrons et donc deux actes photochimiques de la part de la photoréaction I. Dans ces conditions, si l'on superpose une excitation de longueur d'onde variable à celle des « pigments accessoires » (effet d'exaltation dichromatique), c'est une excitation rouge lointain qui sera la plus efficace (cf. par exemple Myers et Graham, 1963).

Le schéma de la figure 29 suppose que seuls les « pigments accessoires » et l'holochrome C673 sensibilisent la photoréaction II ; les holochromes C683 et C700 à leur tour ne sensibilisent que la photoréaction I, bien que celle-ci reçoive aussi l'énergie « excédentaire » de C673. La probabilité des transferts dans le sens C673 → C683 → C700 est beaucoup plus grande que celle des transferts de sens inverse. Les transferts système I → système II sont donc minimes ou inexistants. La dépendance spectrale de l'exaltation dichromatique (Myers et French, 1960) et de l'inhibition par le CMU (ch. V) montre que C673 excite surtout la photo-

réaction II. La chute de rendement de l'émission d'oxygène dans le rouge (Emerson et *al.*, 1957) et l'inefficacité apparente de la chlorophylle comme sensibilisateur de la photosynthèse chez les algues bleues et rouges s'explique si on admet que C683 ne sensibilise que la photoréaction I. La concentration de C700 paraît trop faible (2 - 5 % de la chlorophylle totale, d'après Kok, 1963) pour expliquer ces phénomènes. La lumière absorbée par la chlorophylle chez les algues rouges et bleues est beaucoup moins efficace pour le dégagement d'oxygène que chez les algues et les plantes vertes. Ceci s'explique, dans le cadre de cette hypothèse, par un rapport de concentrations C683/C673 élevé chez les premières et faible chez les secondes.

Kok (1963) a montré que l'émission de fluorescence à 700 mμ disparaît chez un mutant de *Scenedesmus* (isolé par Bishop) privé de C700. Kok suggère donc que C700 émet à 700 mμ ; c'est ce qui est représenté sur la figure 29. L'émission de fluorescence à 717 mμ est orientée, d'après Lavorel (1964). On sait que, chez les algues vertes, cette orientation est parallèle au plan des lamelles du chloroplaste (Olson, 1964). Butler et *al.* (1964) ont montré que cette émission n'est pas due à C700, puisqu'elle existe même chez le mutant de *Scenedesmus* (isolé par Bishop) privé de ce pigment. Ces chercheurs pensent que l'émission à 717 mμ est due à l'holochrome C683, lui-même orienté parallèlement au plan des lamelles, d'après son dichroïsme. Sironval et *al.* (1965) concluent, de leur étude sur l'évolution des holochromes chlorophylliens au cours du verdissement de feuilles d'Orge, que C673 est une forme de chlorophylle *a* et C683 une forme de chlorophyllide *a*. On peut suggérer que les molécules de chlorophyllide sont plus facilement orientables les unes par rapport aux autres à cause de l'absence de la chaîne phytyle.

On a attribué, dans ce schéma, l'émission à 685 mμ et 750 mμ, qui semble caractéristique du système II, à l'holochrome C673 en supposant que ce pigment possède deux bandes d'émission comme la chlorophylle *a* en solution. On suppose que les émissions à 700 mμ et à 717 mμ sont dues à des pigments sensibilisant uniquement la photoréaction I.

Cette attribution de bandes d'émission à des bandes d'absorption connues est forcément assez arbitraire, étant donné l'état des connaissances actuelles. Elle permet cependant de rendre compte de plusieurs observations et en particulier de l'hétérogénéité de l'émission de fluorescence. Comme on l'a exposé plus haut, lorsque Q est réduit, l'énergie arrivant à C673 est transmise au système I ou réémise sous forme de chaleur ou de fluorescence du pigment terminal C673 ; c'est l'émission à 685, 750 mμ. Lorsque Q est oxydé, l'énergie parvenant à C673 est canalisée vers la photoréaction II, et l'émission de fluorescence est relativement plus pauvre en composante 685, 750 mμ. Ces considérations paraissent en accord avec les observations de la figure 28.

Un des mérites de la théorie des « systèmes communiquants » est de prévoir un mécanisme régulateur de la distribution de l'énergie lumineuse. Lorsque Q s'accumule sous sa forme réduite, provoquant ainsi un ralentissement de la photoréaction II, l'énergie absorbée par les pigments du système II est utilisée par la photoréaction I ce qui a pour effet d'oxyder Q. Ce mécanisme autorégulateur doit conférer au système, non seulement une bonne stabilité cinétique, mais aussi un rendement quantique optimum à toutes les longueurs d'onde, sauf dans l'extrême rouge.

Une autre conséquence du schéma 29 est que l'état de P700 ne peut pas exercer de contrôle immédiat sur l'efficacité des transferts C673 $\rightarrow$ C683 $\rightarrow$ C700. Cependant l'état d'oxydo-réduction de P700 doit retentir sur celui de Q et agir ainsi, par voie chimique, sur la distribution de l'énergie entre les systèmes pigmentaires.

Bien qu'il rende compte d'un certain nombre de faits expérimentaux, ce schéma ne prétend être ni complet ni même correct. On a dit plus haut que si tous les pigments paraissent sensibiliser la photoréaction I en présence d'hydrogène, l'extrapolation de ce mécanisme à la photosynthèse aérogène peut ne pas être justifiée. Le schéma proposé est, de plus, incomplet sur nombre de points, faute d'information. N'est-il pas possible, par exemple, que le sensibilisateur immédiat de la photoréaction I soit C683, la fraction pigmentaire orientée, plutôt que C700 ? On n'a pas indiqué, non plus, à quel pigment les caroténoïdes transfèrent leur énergie ; cette énergie semble aller à l'une ou à l'autre photoréaction avec la même efficacité ($\simeq$ 50 %) (Ch. IV), ce qui pourrait porter à croire que les caroténoïdes forment un complexe de composition fixe avec la chlorophylle. Enfin, ce schéma ne tient pas compte de la participation éventuelle d'autres holochromes chlorophylliens ni de la possibilité que les holochromes aient plusieurs bandes d'absorption ou de fluorescence se recouvrant.

2. MÉCANISMES CHIMIQUES DE CONVERSION DE L'ÉNERGIE

On a exposé au Chapitre III les raisons qui font penser que la photoréduction implique une réduction sombre du NADP par l'hydrogène et une photophosphorylation cyclique. En résumé ces raisons sont les suivantes :

1° la similitude du mécanisme de la fixation du CO_2 pour la réaction oxhydrogène, la photoréduction et la photosynthèse aérogène ; cette similitude indique que la réduction du CO_2 procède à partir de $NADPH_2$ et de ATP dans les trois cas.

2° l'existence de la réaction oxhydrogène, qui montre la possibilité d'une réduction de NADP par l'hydrogène sans le concours de la photochimie.

3° l'insensibilité de la photoréduction au CMU, un inhibiteur de la photolyse de l'eau et de la photophosphorylation non cyclique.

La figure 29 donne une représentation schématique du mécanisme envisagé. En photosynthèse aérogène, le NADP est réduit à partir de l'eau avec la coopération des deux réactions photochimiques ; l'ATP est produit à la fois par un mécanisme cyclique et par un mécanisme non-cyclique. Lorsque la concentration d'ATP devient limitante pour la fixation de CO_2, NADP s'accumule sous sa forme réduite ce qui provoque une photophosphorylation cyclique par l'intermédiaire de la ferredoxine (Tagawa et *al.*, 1963). En photoréduction, l'hydrogène activé par l'hydrogénase réduit la ferredoxine (Mortenson et *al.*, 1962 ; Valentine et *al.*, 1962) qui réduit à son tour le NADP par l'intermédiaire d'une flavoprotéine (Tagawa et Arnon, 1962). On a représenté aussi le site probable de l'inhibition par le CMU de l'oxydation de *Q* par la photoréaction I. Le « système *r* » n'est pas présenté comme une entité distincte ; il est assimilé ici au transport cyclique d'électrons.

Une des objections qu'on a élevées contre ce type de mécanisme (Van Niel, 1962 ; Gaffron, 1963) porte sur l'exigence quantique de la photoréduction. Comme la photosynthèse aérogène, la photoréduction aussi bien chez *Scenedesmus*, à 578 mμ, (Rieke, 1949) que chez les Bactéries phototrophes (Larsen et *al.*, 1952 ; Larsen, 1954) exige environ 8 quanta par molécule de CO_2 absorbé. Les arguments contre une photophosphorylation cyclique et une réduction sombre, en photoréduction, reposent principalement sur l'énergétique et sur la biochimie comparée. Le premier argument est que, puisque le fonctionnement du cycle proposé par Calvin exige

trois molécules d'ATP par molécule de CO_2 fixé, 3 quanta par CO_2 devraient suffire amplement à la photoréduction. Le second est que cette identité d'exigence quantique n'est sûrement pas accidentelle mais doit s'expliquer par une similitude des mécanismes. D'après la seconde théorie de Van Niel (1949), le dénominateur commun, entre la photosynthèse de type bactérien et la photosynthèse aérogène, est la photolyse de l'eau. La photolyse de l'eau produit un oxydant (OH) et un réducteur (H) ; certains types de photosynthèse s'accompagnent d'une excrétion de l'oxydant (O_2), d'autres le réduisent à l'aide de substrats exogènes (H_2, H_2S, etc.). Cette théorie établit ainsi une analogie entre des réactions obscures telles que la respiration ou la réaction oxhydrogène et la photosynthèse, le facteur commun étant la réduction d'un oxydant. Dans le cas de la photosynthèse, l'oxydant est produit par la lumière (voir Moyse, 1963*b*, pour un compte rendu détaillé du sujet).

On peut répondre partiellement au premier argument en se plaçant non pas sur le terrain de l'énergétique de la réaction, mais sur celui de son mécanisme. Il suffirait, en effet, que la photophosphorylation cyclique ou non-cyclique implique sinon le même site de phosphorylation, du moins le même type de réaction sombre, pour que son exigence quantique soit la même dans les deux cas. La stoechiométrie de la photophosphorylation non cyclique (Arnon, 1961) est telle que la formation d'une molécule d'ATP s'accompagne du passage de deux électrons :

$$ADP + P + NADP + 2H^+ + 2e^- \xrightarrow{h\nu} ATP + NADPH_2$$

ce qui suppose une exigence minimum de deux quanta par molécule d'ATP. Hoch et Martin (1963) ont d'ailleurs obtenu la réduction d'une molécule de NADP pour deux quanta absorbés, avec le couple dichlorophénol-indophénol et ascorbate. Si la photophosphorylation cyclique s'accompagnait aussi d'une double oxydoréduction, son exigence quantique serait la même ; le cycle de Calvin nécessiterait alors six quanta par molécule de CO_2 fixé, en photoréduction. Je ne connais pas de bonne détermination de l'exigence quantique des deux types de photophosphorylation, qui seule pourrait décider du bien-fondé de cette proposition.

L'exigence quantique minimum de la photosynthèse aérogène devrait être de 8 d'après le schéma de la figure 29 (2 quanta absorbés par électron élevé au potentiel de $NADPH_2$), si l'on ne tient pas compte de la nécessité d'une molécule supplémentaire d'ATP par molécule de CO_2 réduit. Cette exigence passe à 10 si l'on en tient compte. De sorte qu'on aboutit, de toute manière, à une exigence quantique minimum plus élevée pour la photosynthèse aérogène que pour la photoréduction. C'est peut-être par une meilleure connaissance du métabolisme global que l'on pourra résoudre ce problème.

En dépit de cette difficulté, le mécanisme proposé présente de grands avantages du point de vue de la compréhension du processus photosynthétique. Il ne nécessite pas l'existence de la photolyse de l'eau chez les Bactéries phototrophes et chez les Algues en présence d'hydrogène et de CMU, tout en respectant le principe de la biochimie comparée suivant lequel il existe des processus biologiques fondamentaux communs à toutes les formes de vie. L'un de ces processus paraît être une oxydoréduction couplée à la transformation de liaisons à haute teneur énergétique. La phosphorylation apparaît ainsi comme un trait commun entre la respiration, la photosynthèse et la chimiosynthèse (Arnon, 1961 ; Stanier, 1961). En modifiant légèrement la théorie de Van Niel, on peut dire que l'acte photochimique de la photosynthèse provoque bien l'apparition d'un oxydant et d'un réducteur mais pas néces-

sairement à partir de l'eau. Ces deux espèces peuvent se recombiner (processus cyclique) ou bien l'oxydant peut être réduit de diverses manières. L'utilisation de l'eau comme réducteur ne serait alors qu'un cas particulier impliquant, il est vrai, le concours d'un acte photochimique spécial.

Dans les conditions réductrices de l'atmosphère primitive de la planète (UREY, 1962), on peut supposer que les organismes photosynthétiques dominants, du point de vue écologique, furent les Bactéries phototrophes et les Algues photoréductrices (GAFFRON, 1962). A une époque ultérieure, l'appauvrissement de l'atmosphère en hydrogène et peut-être l'apparition de l'oxygène aurait créé des conditions favorables à la multiplication d'organismes utilisant l'eau comme source d'électrons. Dans cette perspective, le cycle de CALVIN et la photoréaction I apparaissent comme des inventions primitives. La photoréaction II représenterait une adaptation évolutive d'origine plus récente.

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à tous ceux qui ont contribué à ma formation scientifique. Je remercie spécialement le Professeur E. PAGE de l'Université de Montréal qui m'a initié à la recherche scientifique.

Au Professeur M. CALVIN de l'Université de Californie qui m'a accueilli dans son équipe, le témoignage de ma reconnaissance et de mon affection.

Le Professeur A. MOYSE a bien voulu se charger de la direction de ce travail. Il m'a prodigué les marques de sa compréhension et de sa sollicitude. Je l'en remercie du fond du cœur.

C'est au Professeur J. LAVOREL que je dois de m'être familiarisé avec les méthodes électrochimiques et les techniques de mesure de fluorescence, sans lesquelles ce travail n'aurait pu être réalisé. Son intérêt constant et sa collaboration scientifiques m'ont été d'un grand secours. Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude et de mon amitié.

Je remercie vivement le Docteur P. JOLIOT des fructueuses discussions et des judicieuses critiques dont a bénéficié la rédaction de ce texte.

Merci à tout le personnel du Laboratoire de Photosynthèse dont la collaboration m'a été précieuse. Je remercie particulièrement M. G. QUAINO qui a réalisé la plupart des montages employés dans ce travail.

J'ai aussi une dette de reconnaissance envers mes amis et camarades de France et d'ailleurs qui m'ont assisté matériellement et moralement.

BIBLIOGRAPHIE

ALLEN F.L. et FRANCK J., 1955 – Photosynthetic evolution of oxygen by flashes of light. *Arch. Biochem. Biophys.*, **58**, 124-143.

ALLEN M.B., FRENCH C.S. et BROWN J.S., 1960 – Native and extractable forms of chlorophyll in various algal groups. In *Comparative Biochemistry of Photoreactive Systems*, M.B. Allen éd., Academic Press, New-York et Londres, 33-52.

AMESZ J. et DUYSENS L.N.M., 1962 – Action spectrum, kinetics and quantum requirement of phosphopyridine nucleotide reduction and cytochrome oxidation in the blue green alga *Anacystis nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta*, **64**, 261-278.

ARNON D.I., 1961 – Cell free photosynthesis and the energy conversion process. In *A Symposium on Light and Life*, W.D. McElroy et B. Glass éd., The Johns Hopkins Press, Baltimore, 489-565.

BADIN E.J. et CALVIN M., 1950 – The path of carbon in photosynthesis. IX Photosynthesis, photoreduction and the hydrogen-oxygen carbon dioxide dark reaction. *J. Amer. Chem. Soc.*, **72**, 5266-5270.

BASSHAM J.A. et CALVIN M., 1957 – *The Path of Carbon in Photosynthesis*. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N.J.

BATES R.G., 1964 – *Determination of pH. Theory and Practice*. John Wiley and Sons, Inc., New-York.

BISHOP N.I., 1958 – The influence of the herbicide, DCMU, on the oxygen-evolving system of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, **27**, 205-207.

BISHOP N.I., 1961 – The photometabolism of glucose by an hydrogen-adapted alga. *Biochim. Biophys. Acta*, **51**, 323-332.

BISHOP N.I. et GAFFRON H., 1963 – On the interrelation of the mechanisms for oxygen and hydrogen evolution in adapted algae. In *Photosynthetic Mechanisms of Green Plants*, B. Kok et A.T. Jagendorf éd., Nat. Acad. Sc., Nat. Res. Council, Publication 1145, Washington, D.C., 441-451.

BLINKS L.R. et SKOW R.K., 1938 – The time course of photosynthesis as shown by the glass electrode with anomalies in the acidity changes. A rapid electrode method for oxygen. *Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.*, **24**, 413-427.

BLINKS L.R. et VAN NIEL C.B., 1963 – The absence of enhancement (Emerson effect) in the photosynthesis of *Rhodospirillum rubrum*. In *Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria*, The Japanese Society of Plant Physiologists, The University of Tokyo Press, 353-372.

BRINKMAN R., MARGARIA R. et ROUGHTON F.J.W., 1933 – Kinetics of the CO_2-H_2CO_3 reaction. *Phil. Trans. Roy. Soc.* Londres, **A.232**, 65-97.

BRODY M. et EMERSON R., 1959 – The effect of wavelength and intensity of light on the proportion of pigments in *Porphyridium cruentum*. *Amer. J. Bot.*, **46**, 433-440.

BRODY S.S., 1958 – New excited state of chlorophyll. *Science*, **128**, 838-839.

BUTLER W.L., 1961 – A far-red absorbing form of chlorophyll *in vivo*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **93**, 413-422.

BUTLER W.L., OLSON R.A. et JENNINGS W.H., 1964 – Oriented chlorophyll *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta*, **88**, 651-653.

CALVIN M., 1956 – The photosynthetic carbon cycle. In *Proc. Third Intern. Cong. Biochemistry, Brussels* 1955. Acad. Press, New-York, 211-225.

CLARK L.C., WOLF R., GRANGER D. et TAYLOR Z., 1953 – Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography, *J. Applied Physiol.*, **6**, 189-193.

CLAYTON R.K., 1963 – Photosynthesis. Primary physical and chemical processes. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **14**, 159-180.

DUYSENS L.N.M., 1952 – Transfer of excitation energy in photosynthesis. *Thèse*, Université d'Utrecht.

DUYSENS L.N.M., 1960 – Cytochrome oxidation by a second photochemical system in the red alga *Porphyridium cruentum*. In *Progress in Photobiology*, Proc. Third Intern. Cong. Photobiology, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 135-142.

DUYSENS L.N.M., 1963 – Studies on the mechanisms of two photosynthetic pigment systems by means of absorption and difference spectrophotometry. In *La Photosynthèse*, Colloque Intern. nº 119, Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, 75-91.

DUYSENS L.N.M., AMESZ J. et KAMP B.M., 1961 – Two photochemical systems in photosynthesis. *Nature*, **190**, 510-511.

DUYSENS L.N.M. et AMESZ J., 1962 – Function and identification of two photochemical systems in photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, **64**, 243-260.

DUYSENS L.N.M. et SWEERS H.L., 1963 – Mechanism of two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence. In *Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria*, The Japanese Society of Plant Physiologists, The University of Tokyo Press, 353-372.

EMERSON R., 1958 *a* – The quantum yield of photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **9**, 1-24.

EMERSON R., 1958 *b* – Yield of photosynthesis from simultaneous illumination with pairs of wavelengths. *Science*, **127**, 1059-1060.

EMERSON R. et ARNOLD W.A., 1932 *a* – A separation of the reactions in photosynthesis by means of intermittent light. *J. Gen. Physiol.*, **15**, 391-420.

EMERSON R. et ARNOLD W., 1932 *b* – The photochemical reactions in photosynthesis. *J. Gen. Physiol.*, **16**, 191-205.

EMERSON R., CHALMERS R. et CEDERSTRAND C., 1957 – Some factors influencing the long-wave limit of photosynthesis. *Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.*, **43**, 133-143.

FORK D.C., 1963 – Action spectra for O_2 evolution by chloroplasts, with and without added substrate, for regeneration of O_2 evolving ability by far-red, and for O_2 uptake. *Plant Physiol.*, **38**, 323-332.

FRENCH C.S., 1937 – The quantum yield of hydrogen and carbon dioxide assimilation in purple bacteria. *J. Gen. Physiol.*, **20**, 711-735.

FRENCH C.S. et ELLIOT R.F., 1957 – The absorption spectra of chlorophylls in various algae. *Carnegie Inst. Wash. Year Book*, **57**, 278-286.

FRENCH C.S. et FORK D.C., 1963 – Two primary photochemical reactions in photosynthesis driven by different pigments. In *Proc. Fifth Intern. Cong. Biochemistry*, Vol. VI, Pergamon Press, New-York, 122-137.

FRENCH C.S. et HUANG H.S., 1956 – The shape of the red absorption band of chlorophyll in live cells. *Carnegie Inst. Wash. Year Book*, **56**, 266-268.

FRENCH C.S. et YOUNG V.K., 1952 – The fluorescence spectra of red algae and the transfer of energy from phycoerythrin to phycocyanin and chlorophyll. *J. Gen. Physiol.*, **35**, 873-890.

FRENKEL A.W. et LEWIN R.A., 1954 – Photoreduction by *Chlamydomonas*. *Amer. J. Bot.*, **41**, 586-589.

FRENKEL A.W. et RIEGER C., 1951 – Photoreduction in algae. *Nature*, **167**, 1030.

GAFFRON H., 1940 – Carbon dioxide reduction with molecular hydrogen in green algae. *Amer. J. Bot.*, **27**, 273-283.

GAFFRON H., 1942 *a* – The effect of specific poisons upon the photoreduction with hydrogen in green algae. *J. Gen. Physiol.*, **26**, 195-217.

GAFFRON H., 1942 *b* – Reduction of carbon dioxide coupled with the oxhydrogen reaction in algae. *J. Gen. Physiol.*, **26**, 241-247.

GAFFRON H., 1944 – Photosynthesis, photoreduction and dark reduction of carbon dioxide in certain algae. *Biol. Revs. Cambridge Phil. Soc.*, **19**, 1-20.

GAFFRON H., 1962 – On dating stages in photochemical evolution. In *Horizons in Biochemistry*, M. Kasha et B. Pullman, éd., Academic Press, New-York, 59-89.

GAFFRON H., 1963 – Van Niel's theory : Thirty years after. In *Bacterial Photosynthesis*, H. Gest, A. San Pietro et L.P. Vernon éd., The Antioch Press, Yellow Springs, Ohio, 3-14.

GAFFRON H. et ROSENBERG J., 1955 – Ueber Rückreaktionen bei der Photosynthese. *Natürwissenschaften*, **42**, 354-364.

GINGRAS G., 1963 – Une méthode de mesure directe des vitesses d'échanges de CO_2 : application à la photosynthèse. *Physiol. Vég.*, **1**, 369-373.

GINGRAS G., 1965 – Pigments sensibilisateurs de la photoréduction. In *Currents in Photosynthesis*, J.B. Thomas et J.C. Goedheer éd., Uitgeversmaatschappij Ad. Donker, Publ., sous presse.

GINGRAS G., GOLDSBY R.A. et CALVIN M., 1960 – Carbon dioxide metabolism in hydrogen adapted *Scenedesmus*. *University of California Radiation Laboratory Quaterly Report*, UCRL-9652.

GINGRAS G., GOLDSBY R.A. et CALVIN M., 1963 *a* – Carbon dioxide metabolism in hydrogen adapted *Scenedesmus*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **100**, 178-184.

GINGRAS G. et LAVOREL J., 1965 – Propriétés de fluorescence de *Scenedesmus* adapté à l'hydrogène. *Physiol. Vég.*, **3**, 109-120.

GINGRAS G., LEMASSON C. et FORK D.C., 1963 *b* – A study of the mode of action of 3-(4-chlorophenyl)-1,1-dimethylurea on photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, **69**, 438-440.

GINGRAS G. et LEMASSON C., 1965 – A study of the mode of action of 3-(4-chlorophenyl)-1,1-dimethylurea on photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, **109**, 67-78.

GŒDHEER J.C., 1963 – A cooperation of two pigment systems and respiration in photosynthetic luminescence. *Biochim. Biophys. Acta*, **66**, 61-71.

GOLDSBY R.A., 1961 – *Thèse*, Université de Californie (Berkeley).

HARNED H.S. et DAVIS R., 1943 – The ionization constant of carbonic acid in water and the solubility of carbon dioxide in water and aqueous salt solutions from 0 to 50°. *J. Amer. Chem. Soc.*, **65**, 2030-2037.

HARNED H.S. et SCHOLES S.R., 1941 – The ionization constant of HCO_3^- from 0° to 50°. *J. Amer. Chem. Soc.*, **63**, 1706-1709.

HARRIS D.G. et ZSCHEILE F.P., 1943 – Effects of solvent on absorption spectra of chlorophylls *a* and *b* ; their ultra-violet absorption spectra in ether solution. *Botan. Gaz.*, **104**, 515-527.

HARTMAN H. et KRASNA A.I., 1964 – Properties of the hydrogenase of *Scenedesmus*. *Biochim. Biophys. Acta*, **92**, 52-58.

HAXO F.T. et BLINKS L.R., 1950 – Photosynthetic action spectra of marine algae. *J. Gen. Physiol.*, **33**, 389-422.

HERTZ C.H. et SIESJÖ B., 1959 – A rapid and sensitive electrode for continuous measurement of pCO_2 in liquids and tissue. *Acta Physiol. Scand.*, **47**, 115-123.

HILL R. et BENDALL F., 1960 – Function of the two cytochrome components in chloroplasts : a working hypothesis. *Nature*, **186**, 136-137.

HOCH G. et KOK B., 1961 – Photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **12**, 155-194.

HOCH G. et MARTIN I., 1963 – Two light reactions in TPN reduction by spinach chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.*, **102**, 430-438.

HOMANN P. et GAFFRON H., 1964 – Photochemistry and metal catalysis : studies on a flavin sensitized oxidation of ascorbate. *Photochem. Photobiol.*, **3**, 499-519.

IZAWA S. et GOOD N.E., 1965 – The number of sites sensitive to 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea, 3-(4-chlorophenyl)-1,1-dimethylurea and 2-chloro-4-(2-propylamino)-6-ethylamino-s-triazine in isolated chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, **102**, 20-38.

JANZ G.J., 1961 – Silver-silver halide electrodes. In *Reference Electrodes Theory and Practice*, D.J.G. Ives et G.J. Janz éd., Academic Press, New-York et Londres, p. 206.

JOLIOT P., 1961 – Contribution à l'étude des phénomènes d'induction de la photosynthèse. *Thèse* (Etat), Université de Paris.

JOLIOT P., 1965 – Cinétiques des réactions liées à l'émission d'oxygène photosynthétique. *Biochim. Biophys. Acta*, **102**, 116-134.

JONES R.F., SPEER H.L. et KURY W., 1963 – Studies on the growth of the red alga *Porphyridium cruentum*. *Physiol. Plantarum*, **16**, 636-643.

KAUTSKY H. et FRANCK U., 1943 – Chlorophyllfluorescenz und Kohlensaüreassimilation, IX-XII. *Biochem. Z.*, **315**, 139-232.

KESSLER E., 1957 – Stoffwechselphysiologische Untersuchungen an Hydrogenase enhaltenden Grünalgen. I. Ueber die Rolle des Mangans bei Photoreduktion und Photosynthese. *Planta*, **49**, 505-523.

KESSLER E., LANGNER W., LUDEWIG I. et WIECHMANN H., 1963 – Bildung von Sekundär-Carotinoiden bei Stickstoff-Mangel und Hydrogenase-Aktivität als Taxonomische Merkmale in der Gattung *Chlorella*. In *Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria*, The Japanese Society of Plant Physiologists, The University of Tokyo Press, 7-20.

KIELLAND J., 1937 – Individual activity coefficients of ions in aqueous solutions. *J. Amer. Chem. Soc.*, **59**, 1675-1678.

KOK B., 1963 – Fluorescence studies. In *Photosynthetic Mechanisms of Green Plants*, B. Kok et A.T. Jagendorf éd., Nat. Acad. Sc., Nat. Res. Council, Publication 1145, Washington, D.C., 45-55.

KOK B. et GOTT W., 1960 – Activation spectra of 700 mμ absorption change in photosynthesis. *Plant Physiol.*, **35**, 802-808.

KOK B. et HOCH G., 1961 – Spectral changes in photosynthesis. In *Light and Life*, McElroy W.D. et Glass B. éd., The Johns Hopkins Press, Baltimore, 397-416.

de KOUCHKOVSKY Y., 1963 – La pluralité des réactions photochimiques en photosynthèse. *Physiol. Vég.*, **1**, 325-357.

KROGMANN D.W., 1958 – Oxidative photosynthetic phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta*, **30**, 655-656.

KROGMANN D.W., 1960 – Further studies on oxidative photosynthetic phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, **235**, 3630-3634.

LARSEN H., 1954 – The photolitho-autotrophic bacteria and their energy relations. *Symposium Soc. Gen. Microbiol.*, **4**, 186-201.

LARSEN H., YOCUM C.S. et Van NIEL C.B., 1952 – On the energetics of the photosynthesis in green sulfur bacteria. *J. Gen. Physiol.*, **36**, 161-171.

LAVOREL J., 1959 – Induction of fluorescence in quinone poisoned *Chlorella* cells. *Plant Physiol.*, **34**, 204-209.

LAVOREL J., 1962 – Hétérogénéité de la chlorophylle *in vivo*. I. Spectres d'émission de fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta*, **60**, 510-523.

LAVOREL J., 1964 – Hétérogénéité de la chlorophylle *in vivo*. II. Polarisation et spectres d'action de fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta*, **88**, 20-36.

LAVOREL J., 1965 *a* – A study of chlorophyll fluorescence *in vivo* by a flow method. *Photochem. Photobiol.*, **4**, 819-828.

LAVOREL J., 1965 *b* – Cinétique de la fluorescence photostimulée de la chlorophylle *in vivo*. In *Currents in Photosynthesis*, J.B. Thomas et J.C. Goedheer éd., Uitgeversmaatschappij Ad. Donker, Publ., sous presse.

LOSADA M., WHATLEY F.R. et ARNON D.I., 1961 – Separation of two light reactions in noncyclic photophosphorylation of green plants. *Nature*, **190**, 606-610.

Mac INNES D.A. et DOLE M., 1930 – Behavior of glass electrodes of different compositions. *J. Amer. Chem. Soc.*, **52**, 29-36.

MILHAUD G., AUBERT J.P. et MILLET J., 1956 – Métabolisme du carbone dans la chimioautotrophie. Cycle d'assimilation de l'anhydride carbonique. *C. R. Acad. Sc., Paris*, **243**, 102-105.

MORTENSON L.E., VALENTINE R.C. et CARNAHAN J.E., 1962 – An electron transport factor from *Clostridium pasteurianum*. *Biochem. Biophys. Res. Communic.*, **7**, 448-452.

MOYSE A., 1963 *a* – Les chimiosynthèses bactériennes, le rôle des oxydations. In *Problèmes de métabolisme respiratoire et d'oxydations cellulaires*, J. A. Thomas éd., Masson et Cie, Paris, 115-148.

MOYSE A., 1963 *b* – La photosynthèse bactérienne, le rôle des substances réductrices. *Op. cit.*, 149-203.

MOYSE A., COUDERC D., DARRAS J., HAUSFATER J., 1956 – Etude de la croissance d'algues monocellulaires (Chlorelles et espèces voisines) en cultures accélérées. II. Vitesse de croissance et milieux de culture. *Journ. Rech. CNRS*, **35**, 177-192.

MYERS J., 1947 – Culture conditions and the development of the photosynthetic mechanism. V. Influence of the composition of the nutrient medium. *Plant Physiol.*, **22**, 590-597.

MYERS J., 1963 – Enhancement. In *Photosynthetic Mechanisms of Green Plants*, B. Kok et A.T. Jagendorf éd., Nat. Acad. Sc. Nat. Res. Council, Publication 1145, Washington, D.C., 301-317.

MYERS J. et FRENCH C.S., 1960 – Evidences from action spectra for a specific participation of chlorophyll *b* in photosynthesis. *J. Gen. Physiol.*, **43**, 723-736.

MYERS J. et GRAHAM J.R., 1963 – Enhancement in *Chlorella*. *Plant Physiol.*, **38**, 105-116.

NODDACK W. et KOPP C., 1940 – Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensaüre durch die grünen Pflanzen. IV. Assimilation und Temperatur. *Z. physik. Chem.*, **A-187**, 79-102.

NORRIS L., NORRIS R.E. et CALVIN M., 1955 – A survey of the rates and products of short term photosynthesis in plants of nine phyla. *J. Exp. Bot.*, **16**, 64-74.

OLSON R.A., JENNINGS W.H. et BUTLER W.L., 1964 – Molecular orientation : spectral dependence of bifluorescence of chloroplasts *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta*, **88**, 331-337.

PRINGSHEIM E.G. et WIESSNER W., 1960 – Photoassimilation of acetate by green organisms. *Nature*, **188**, 919-921.

RABINOWITCH E., 1956 – *Photosynthesis and related processes*, Vol. II, 2. Interscience Publishers Inc., New-York, 1238-1240.

RIEKE F., 1949 – Quantum efficiency for photosynthesis and photoreduction in green plants. In *Photosynthesis in Plants*, J. Franck et W.E. Loomis éd., The Iowa State College Press, Ames Iowa, 251-272.

ROSENBERG J.L., 1954 – Use of a glass electrode for measuring rapid changes in photosynthetic rates. *J. Gen. Physiol.*, **37**, 753-774.

ROSENBERG J.L., BIGAT T. et DEJAEGERE S., 1964 – Fluorescence studies of the photosynthetic induction period. *Biochim. Biophys. Acta*, **79**, 9-19.

SEVERINGHAUS J.W. et BRADLEY A.F., 1958 – Electrodes for blood pO_2 and pCO_2 determination. *J. Applied Physiol.*, **13**, 515-520.

SHEN YVEN-KANG et SHEN GONG-MAO, 1962 – Studies on photophosphorylation. II. The « Light intensity effect » and the intermediate steps of photophosphorylation. *Acta Biochim. Biophys. Sinica*, **2**, 58-66.

SHIBATA K., BENSON A.A. et CALVIN M., 1954 – The absorption spectra of suspensions of living microorganisms. *Biochim. Biophys. Acta*, **15**, 461-470.

SIRONVAL C., MICHEL-WOLWERTZ M.R. et MADSEN A., 1965 – On the nature and possible functions of the 673 and 684 mμ forms *in vivo* of chlorophyll. *Biochim. Biophys. Acta*, **94**, 344-354.

SMITH J.H.C. et FRENCH C.S., 1963 – The major and accessory pigments in photosynthesis., *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **14**, 181-224.

SPIKES J.D., 1956 – Effects of substituted ureas on the photochemical activity of isolated chloroplasts. *Plant Physiol.*, **31**, suppl. xxxii.

STANIER R.Y., 1961 – Photosynthetic mechanisms in bacteria and plants : development of a unitary concept. *Bacteriol. Rev.*, **25**, 1-18.

STARR R.C., 1964 – The culture collection of algae at Indiana University. *Amer. J. Bot.*, **52**, 1013-1044.

STOPPANI A.O.M., FULLER R.C. et CALVIN M., 1955 – Carbon dioxide fixation by *Rhodopseudomonas capsulatus*. *J. Bacteriol.*, **69**, 491-501.

STOW R.W., BAER R.F. et RANDALL B.F., 1957 – Rapid measurement of the tension of carbon dioxide in blood. *Arch. Phys. Med.*, **38**, 646-650.

SWEETSER P.B., 1963 – Photoinactivation of monuron, 3-(p-chlorophenyl)-1, 1-dimethylurea by riboflavin 5-phosphate. *Biochim. Biophys. Acta*, **66**, 78-85.

TAGAWA K. et ARNON D.I., 1962 – Ferredoxins as electron carriers in photosynthesis and in the biological production and consumption of hydrogen gas. *Nature*, **195**, 537-543.

TAGAWA K., TSUJIMOTO H.Y. et ARNON D.I., 1963 – Role of chloroplast ferredoxin in the energy conversion process of photosynthesis. *Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.*, **49**, 567-572.

TURNER J.F., BLACK C.C. et GIBBS M., 1962 – Studies on photosynthetic processes. I. The effect of light intensity on triphosphopyridine nucleotide reduction, adenosine triphosphate formation, and carbon dioxide assimilation in spinach chloroplasts. *J. Biol. Chem.*, **237**, 577-579.

UMBREIT W.W., BURRIS R.H., STAUFFER J.F., 1957 – *Manometric techniques*. Burgess Publishing Co, Minneapolis, p. 21.

UREY H.C., 1962 – L'atmosphère primitive des planètes et l'origine de la vie. In *L'origine de la vie, quelques aspects du problème*, M. Florkin éd., Gauthier-Villars, Paris, 26-35.

VALENTINE R.C., JACKSON R.L. et WOLFE R.S., 1962 – Role of ferredoxin in hydrogen metabolism of *Micrococcus lactilyticus*. *Biochem. Biophys. Res. Communic.*, **7**, 453-456.

VAN NIEL C.B., 1949 – The Comparative Biochemistry of Photosynthesis. In *Photosynthesis in Plants*, J. Franck et W.E. Loomis éd., The Iowa State College Press, Ames Iowa, 437-495.

VAN NIEL C.B., 1962 – The present status of the comparative study of photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **13**, 1-26.

WESSELS J.C. et VAN DER VEEN R., 1956 – The action of some derivatives of phenylurethane and of 3-phenyl-1, 1-dimethylurea on the Hill reaction. *Biochim. Biophys. Acta*, **19**, 548-549.

WHATLEY F.R., ALLEN M.B. et ARNON D.I., 1959 – Photosynthesis by isolated chloroplasts. VII. Vitamin K and riboflavin phosphate as cofactors of cyclic photophosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta*, **32**, 32-46.

WHITTINGHAM C.P. et BISHOP P.M., 1963 – Studies with flash-illumination on the enhancement effect in chloroplasts. In *Photosynthetic Mechanisms of Green Plants*, B. Kok et A.T. Jagendorf éd., Nat. Acad. Sc., Nat. Res. Council, Publication 1145, Washington, D.C., 371-380.

WHITTINGHAM C.P. et BROWN A.H., 1958 – Oxygen evolution from algae illuminated by short and long flashes of light. *J. Exp. Bot.*, **9**, 311-319.

Table des Matières

Pages

I – INTRODUCTION 2

II – TECHNIQUES 3

1. Matériel biologique 3
2. Séparation et identification de métabolites marqués 4
3. Mesure de la fluorescence *in vivo* 4
4. Mesure des spectres d'action 5
5. Mesure des échanges gazeux 5

A Préparation des mélanges gazeux 5
B Mesure de l'oxygène 5
C Mesure du gaz carbonique 6
D Mesures simultanées des vitesses d'échanges d'oxygène et de gaz carbonique 16

III – MÉCANISMES DE LA RÉDUCTION DU CO_2 18

1. Introduction 18
2. Description de la méthode 18
3. Conditions expérimentales – 19
4. Résultats 19
5. Discussion 21

IV – PIGMENTS SENSIBILISATEURS DE LA PHOTOSYNTHÈSE ET DE LA PHOTORÉDUCTION 22

1. Introduction 22
2. Conditions expérimentales 23
3. La photoréduction en fonction de l'intensité lumineuse 24
4. L'effet d'exaltation dichromatique chez *Porphyridium* en photosynthèse ; son absence en photoréduction 26
5. Spectres d'action de la photosynthèse et de la photoréduction 29
6. Discussion 32

V – MODE D'INHIBITION DU DÉGAGEMENT D'O_2 PAR LA 3-(4-CHLOROPHÉNYL)-1,1-DIMÉTHYLURÉE 35

1. Introduction 35
2. Conditions expérimentales 36
3. Inhibition du dégagement stationnaire d'O_2 36
4. Tentative de localisation du site d'inhibition Etudes cinétiques 40
5. Discussion 42

VI – ÉTUDES CINÉTIQUES ET SPECTROSCOPIQUES DE LA FLUORESCENCE CHEZ *SCENEDESMUS* 44

1. Introduction 44
2. Conditions expérimentales 44
3. Propriétés d'induction de fluorescence 45
4. Hétérogénéité de l'émission de fluorescence 49
5. Discussion 51

VII – DISCUSSION GÉNÉRALE 53

1. Systèmes pigmentaires, composition et transferts d'énergie 53
2. Mécanismes chimiques de conversion de l'énergie 57

BIBLIOGRAPHIE 5

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

MÉCANISMES POSSIBLES DE SÉPARATION DES CHARGES DANS LES RÉACTIONS PHOTOSYNTHÉTIQUES PRIMAIRES.

Vu et approuvé :
Orsay, le 10 janvier 1966
Le Doyen de la Faculté des Sciences
J. BERGERARD

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris
Jean ROCHE

IMPRIMÉ EN FRANCE
IMPRIMERIE MARCEL BON
70 - VESOUL - D.L. ÉD. 1428. 20-3-66